



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

FACULTAD DE MEDICINA

**PARTICIPACIÓN DE Bcl-2 Y Mcl-1 EN LA INHIBICIÓN DE LA APOPTOSIS EJERCIDA POR
Leishmania mexicana EN LAS CÉLULAS DENDRÍTICAS**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA:

M. EN C. RODRÍGUEZ GONZÁLEZ JORGE

**TUTORA PRINCIPAL DE TESIS: DRA. LAILA GUTIÉRREZ KOBEH
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM**

**COMITÉ TUTOR: DRA. ROSA ESTELA NAVARRO GONZÁLEZ
INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR, UNAM**

**DRA. EDDA LYDIA SCIUTTO CONDE
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS, UNAM**

CIUDAD UNIVERSITARIA, CD. MX., 2022



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

FACULTAD DE MEDICINA

**PARTICIPACIÓN DE Bcl-2 Y McI-1 EN LA INHIBICIÓN DE LA APOPTOSIS EJERCIDA POR
Leishmania mexicana EN LAS CÉLULAS DENDRÍTICAS**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA:

M. EN C. RODRÍGUEZ GONZÁLEZ JORGE

**TUTORA PRINCIPAL DE TESIS: DRA. LAILA GUTIÉRREZ KOBEH
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM**

**COMITÉ TUTOR: DRA. ROSA ESTELA NAVARRO GONZÁLEZ
INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR, UNAM**

**DRA. EDDA LYDIA SCIUTTO CONDE
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS, UNAM**

CIUDAD UNIVERSITARIA, CD. MX., 2022

COORDINACIÓN DEL POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE MEDICINA

OFICIO CPCB/736/2022

ASUNTO: Oficio de Jurado

M. en C. Ivonne Ramírez Wence
Directora General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Me permito informar a usted qué en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día **2 de mayo de 2022** se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **DOCTOR EN CIENCIAS** del estudiante **RODRÍGUEZ GONZÁLEZ JORGE** con número de cuenta **300114337** con la tesis titulada **“PARTICIPACIÓN DE BCL-2 Y MCL-1 EN LA INHIBICIÓN DE LA APOPTOSIS EJERCIDA POR *Leishmania mexicana* EN LAS CÉLULAS DENDRÍTICAS”**, realizada bajo la dirección de la **DRA. LAILA GUTIÉRREZ KOBEH**, quedando integrado de la siguiente manera:

Presidente: DRA. NORMA DEL CARMEN GALINDO SEVILLA
Vocal: DRA. MARÍA LUCIA TAYLOR DA CUNHA E MELLO
Vocal: DR. ROGELIO ALEJANDRO ALONSO MORALES
Vocal: DRA. MARÍA LUISA ESCOBAR SÁNCHEZ
Secretario: DRA. ROSA ESTELA NAVARRO GONZÁLEZ

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE
“POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU”
Ciudad Universitaria, Cd. Mx., a 16 de agosto de 2022

COORDINADOR DEL PROGRAMA



DR. ADOLFO GERARDO NAVARRO SIGÜENZA



Agradecimientos

Al Posgrado en Ciencias Biológicas, UNAM.

Al apoyo recibido por parte de CONACYT a través de la beca número 481304.

Al programa PAPIIT, DGAPA, UNAM, número IN218119, por el financiamiento otorgado al presente trabajo.

Al programa PAPIIT, DGAPA, UNAM, número IN214522, por el financiamiento otorgado para finalizar el presente trabajo.

Al programa PAPIIT, DGAPA, UNAM, número IN218119, por la beca 394521 que me permitió concluir la escritura del presente trabajo.

Al programa PAPIIT, DGAPA, UNAM, número IN214522, por la beca 118922 para lograr la obtención del grado.

A mi tutora, la Dra. Laila Gutiérrez Kobeh, por permitirme trabajar a su lado, por la formación recibida, por la libertad para desarrollar mis propias ideas, por la confianza que me dio, por su ayuda que en todo momento fue más allá de su deber como tutora, pero sobre todo por el cariño hacia mí y hacia mis hijas y la amistad que se forjó durante todos estos años. Sin ella como tutora no habría podido llegar a este nivel académico. ¡Muchas gracias!

A mi comité tutor, en una primera instancia conformado por la Dra. Rosa Estela Navarro González y el Dr. Javier Rolando Ambrosio Hernández, quien desgraciadamente falleció durante esta terrible pandemia. Por último, a la doctora Edda Lydia Sciutto Conde quien amablemente aceptó formar parte de mi comité tutor para de esta manera finalizar el proyecto iniciado con el Dr. Ambrosio.

Resulta realmente excepcional coincidir en este universo con alguien que puedas desarrollar una profunda conexión, amor y respeto mutuo. Platicar y recién conocer a una extraña y que se sienta como si solo hubiésemos estado separados un poco tiempo y este fuera el momento para ponernos al día y contarnos todo lo que habíamos dejado de contarnos. Conocer a alguien así es un verdadero milagro y yo tuve la gracia de compartir con usted, muy pocos años, apenas un pestañear del universo y, sin embargo, solo ese tiempo bastó para que usted dejara una profunda huella en mi conciencia. Ahora solo me queda el recuerdo del último abrazo que nos dimos, de las tantas veces que reímos, de los cigarros que nos fumamos, de las comidas que compartimos, de las veces que nos enojamos, la ira y la tristeza de haberla perdido de nuevo.

Con mucho cariño, a la memoria de Susana Saldaña Castañeda.

Índice

Resumen.....	1
Abstract.....	2
1. Introducción.....	3
1.1 Leishmaniasis.....	3
1.1.2 Leishmaniasis en México.....	4
1.2 <i>Leishmania</i>	5
1.2.1 <i>Leishmania mexicana</i>	6
1.3 Respuesta inmune contra <i>Leishmania</i>	8
1.3.1 Interacción de <i>Leishmania</i> con las células dendríticas.....	9
1.4 La apoptosis.....	11
1.4.1 Vías de inducción de la apoptosis.....	13
1.4.2 Proteínas que regulan la MOMP.....	16
1.5 Vías de señalización durante la apoptosis.....	17
1.5.1 Vía de señalización de las MAPK durante la apoptosis.....	17
1.5.2 Vía de señalización de Akt durante la apoptosis.....	18
1.6 Modulación de la apoptosis por <i>Leishmania</i>	19
2. Planteamiento del problema.....	27
3. Objetivos.....	28
3.1 Objetivo general.....	28
3.2 Objetivos específicos.....	28
4. Hipótesis.....	29
5. Metodología.....	30
5.1 Cultivo de células dendríticas derivadas de monocitos de sangre periférica humana (moDC).....	30

5.2 Caracterización de las moDC.....	30
5.3 Cultivo de los promastigotes de <i>Leishmania mexicana</i>	31
5.4 Infección y estímulo de las moDC.....	32
5.5 Determinación de la sobrevivencia de <i>L. mexicana</i>	33
5.6 Evaluación de la MOMP en las moDC.....	33
5.7 Evaluación de la presencia proteínica de la caspasa 3, Bcl-2, Mcl-1 y Bcl-xL	33
5.8 Análisis estadístico.....	35
6. Resultados.....	36
6.1 Caracterización de las moDC.....	36
6.2 <i>L. mexicana</i> permanece viable después de ser fagocitada por las moDC y expuesta al inhibidor de Akt y a la CPT.....	38
6.3 El inhibidor de Akt previene la inhibición de la MOMP inducido por <i>L. mexicana</i> en las moDC.....	39
6.4 El inhibidor de Akt previene la inhibición de la activación de la caspasa 3 en la moDC infectadas.....	41
6.5 La infección de las moDC induce un decremento en la presencia proteínica de Bcl-2	42
6.6 La infección de las moDC induce un cambio de isoforma de Mcl-1	44
6.7 El inhibidor de Akt previene el incremento de Bcl-xL en las moDC infectadas.....	46
7. Discusión.....	48
8. Conclusión.....	53
9. Referencias bibliográficas.....	54
Anexo: artículo requisito para la obtención del grado.....	64

Resumen

Leishmania es un parásito intracelular obligado que infecta principalmente células del sistema fagocítico mononuclear como los macrófagos y las células. *Leishmania* sobrevive exitosamente dentro de las células hospederas gracias a que es capaz de modular los mecanismos microbicidas de la célula, la respuesta inmune y de manera muy interesante la apoptosis. La apoptosis es un tipo de muerte celular programada altamente regulada en la que intervienen distintas proteínas y vías de transducción de señales. Nuestro grupo de trabajo ha demostrado que en las células dendríticas humanas derivadas de monocitos de sangre periférica (moDC) infectadas tanto con promastigotes como con amastigotes de *L. mexicana* se incrementa la presencia de la proteína Bcl-xL y se mantiene activa la vía de señalización de Akt durante hasta 24 horas. Además, en las moDC infectadas con promastigotes se incrementa la presencia de Bcl-xL. El objetivo del presente trabajo fue analizar si la infección de las moDC con promastigotes metacíclicos incrementa la presencia de otras proteínas antiapoptóticas tales como Bcl-2 y Mcl-1 y si este incremento depende de la activación de Akt. Nuestros resultados muestran que la infección de las moDC, contrario a lo esperado, disminuye la presencia de las proteínas Bcl-2 y Mcl-1 independientemente de la activación de Akt. Por otro lado, la infección de las moDC induce un incremento de Bcl-xL, mientras que al inhibir a Akt se previene dicho incremento. Al analizar otros parámetros apoptóticos como la pérdida de la permeabilidad de la membrana externa de la mitocondria (MOMP) y la activación de la caspasa 3 encontramos que la inhibición de Akt previene la inhibición de dichos parámetros en las moDC infectadas. Nuestros resultados nos permiten concluir que la vía de transducción de señales de Akt resulta de suma importancia para que *Leishmania mexicana* logre inhibir la apoptosis en las moDC a través del incremento en la presencia de Bcl-xL.

Abstract

Leishmania is an obligate intracellular parasite that infects several cell types including macrophages and dendritic cells (DC). In order to survive in host cells, *Leishmania* displays a wide array of strategies to regulate different cellular events, including apoptosis. Inhibition of host cell apoptosis is a mechanism employed by multiple pathogens to ensure their survival in the infected cell. We have previously reported that *Leishmania mexicana* promastigotes and amastigotes inhibit camptothecin (CPT)-induced apoptosis of monocyte-derived dendritic cells (moDC) through the downregulation of p38 and JNK phosphorylation, while Akt is maintained active for 24 hours. In addition, the infection of DC with *L. mexicana* promastigotes increases the protein presence of Bcl-xL. In the present work we analyzed if Akt activation is related to the inhibition of apoptosis of moDC and with the modulation of the expression of the antiapoptotic proteins of the Bcl-2 family. Our results show that the specific inhibition of Akt prevents the inhibition of apoptosis and the increase of the antiapoptotic protein Bcl-xL in moDC infected with *L. mexicana* metacyclic promastigotes. Interestingly, we also found that the infection of moDC with *L. mexicana* promastigotes induces a decrease in Bcl-2 along with an isoform change of Mcl-1, this independently to Akt activity.

1. Introducción

1.1 Leishmaniasis

La leishmaniasis es una enfermedad tropical desatendida asociada a la pobreza, la cual es transmitida por dípteros hematófagos de la familia de los flebotominos (genero *Lutzomyia*, para el continente americano y *Phlebotomus* para Europa, Asia y África), que al alimentarse de su hospedero transmiten el parásito *Leishmania*. La leishmaniasis se distribuye en las zonas tropicales y subtropicales. Se estima que la leishmaniasis tiene una incidencia anual de un millón de casos nuevos, mientras que la población en riesgo de contraer la enfermedad es de mil millones de personas (OMS).

La leishmaniasis tiene varios cuadros clínicos, la leishmaniasis cutánea, la leishmaniasis mucocutánea y la leishmaniasis visceral. La leishmaniasis cutánea es la forma más común de la enfermedad, se caracteriza por lesiones en la piel, principalmente úlceras, pápulas y placas. La leishmaniasis mucocutánea se caracteriza porque la infección afecta y destruye la mucosa orofaríngea. La leishmaniasis visceral afecta principalmente al hígado y al bazo, causando hepatomegalia y esplenomegalia, causa también episodios irregulares de fiebre, pérdida de peso y anemia. La leishmaniasis visceral es la forma más agresiva de la enfermedad, ya que en el 95% de los casos es mortal si no se recibe atención médica adecuada (OMS).

Antes de 2017 los países afectados por los diferentes tipos de leishmaniasis eran 93, sin embargo, para 2018 el número de países afectados aumentó a 97, lo que ha sido asociado al cambio climático, las zonas en conflicto armado y el desplazamiento de comunidades enteras. Un ejemplo de esto es Siria, donde el aumento de casos es exponencial desde que comenzó el conflicto armado. En contraste, la leishmaniasis visceral ha mantenido una tendencia a la baja, principalmente, gracias a los grandes esfuerzos que han hecho los países del sureste asiático para erradicarla. Por otro lado, es interesante también notar que en 2018 se reportó el primer caso de leishmaniasis visceral en Uruguay, un país al que no se le consideraba endémico de la enfermedad (OMS, Burza et al., 2018). Esto muestra los

efectos del cambio climático en la distribución biogeográfica tanto del vector como de *Leishmania*.

A nivel mundial, los diferentes cuadros clínicos de la leishmaniasis se asocian con al menos 20 especies de *Leishmania*. Cabe mencionar que el cuadro clínico de la leishmaniasis y la severidad de este depende también del fondo genético del hospedero. A nivel mundial, las especies que causan leishmaniasis visceral son principalmente *L. donovani* en India, Bangladesh, Etiopia y Sudan. Mientras que, *L. infantum* afecta principalmente a China, el sur de Europa, América central y Suramérica. Las principales especies que causan leishmaniasis cutánea son: *L. major* en Medio Oriente, Asia central y al norte y oeste de África. *L. tropica* al este del Mediterráneo, en Medio Oriente y al noreste y sur de África. *L. amazonensis* junto con *L. braziliensis* y *L. guayanensis* que afectan Centroamérica y Suramérica, aunque las últimas dos también pueden causar leishmaniasis mucocutánea (Burza et al., 2018).

1.1.2 Leishmaniasis en México

En México, el principal agente causal de la leishmaniasis es *Leishmania mexicana*, sin embargo, se encuentran presentes también *L. infantum* y *L. braziliensis*. Además, es importante señalar que *L. mexicana* se distribuye tanto en México como en Centroamérica y parte de Suramérica (CENAPRECE, 2015).

En México se presentan los cuatro tipos de leishmaniasis, la leishmaniasis cutánea localizada (LCL), la leishmaniasis cutánea difusa (LCD), la leishmaniasis mucocutánea (LMC) y la leishmaniasis visceral (LV). Generalmente las personas infectadas con *L. mexicana* desarrollan LCL, la cual se caracteriza por úlceras en las partes del cuerpo expuestas a las picaduras del vector transmisor. Las úlceras son de bordes indurados, de fondo limpio que generalmente no causan dolor; cuando las úlceras se presentan en tejido cartilaginoso como orejas y nariz pueden llegar a causar mutilación de estas extremidades. De manera interesante, LCL puede llegar a curar de manera espontánea sin necesidad de tratamiento, aunque cuando se aplica, responde muy bien. Por otro lado, *L. mexicana* puede causar otro tipo de leishmaniasis llamada leishmaniasis cutánea difusa que se caracteriza por nódulos y pápulas no ulcerantes, que se extienden por todo el tegumento. Al inocular extractos crudos de *Leishmania* obtenidos a partir de cultivos axénicos (también llamado

leishmanina) en la piel de los pacientes no se observa intradermorreacción, mientras que en las biopsias de la dermis se observa una elevada carga parasitaria, lo que en conjunto refleja la poca o nula respuesta inmune en contra del parásito. La leishmaniasis cutánea difusa es refractaria al tratamiento, el cual consiste, generalmente, de quimioterapias con antimoniales pentavalentes. Otra especie de *Leishmania*, *L. braziliensis* puede causar tanto leishmaniasis cutánea localizada, como leishmaniasis mucocutánea (Burza et al., 2018).

Al igual que en toda América, la leishmaniasis visceral en México es causada por *L. infantum* (*syn. L. chagasi*). Chiapas es el estado donde se han observado más casos de leishmaniasis visceral, aunque se presentan de manera anual, afectando principalmente a niños menores de 5 años y adultos mayores (CENAPRECE, 2015, Burza et al., 2018).

Según datos oficiales, la leishmaniasis cutánea localizada representa el 99% de los casos documentados en el país, mientras que el restante 1% se distribuye entre la leishmaniasis cutánea difusa, mucocutánea y visceral. En conjunto afectan principalmente a personas del sexo masculino en edad económicamente productiva que va de los 15 a 45 años y que laboran en el cultivo de cafetales, cacaoales y, tradicionalmente, en la extracción de la savia del chicozapote o árbol del chicle. Actualmente, se reporta que son trece las entidades federativas afectadas por la leishmaniasis, sin embargo, históricamente son 17 las entidades afectadas, para tener un aproximado de 9 millones de personas en riesgo de contraer la enfermedad (CENAPRECE, 2015).

1.2 *Leishmania*

Leishmania es un género de protozoarios parásitos obligados, al cual pertenecen las especies causantes de los distintos tipos de leishmaniasis, cuya clasificación taxonómica más aceptada es la siguiente:

Imperio ***Eukaryota*** (Cavalier-Smith, 1998)

Reino ***Protozoa*** (Goldfuss, 1818)

Phylum ***Euglenozoa*** (Cavalier-Smith, 1981)

Clase ***Kinetoplastida*** (Honigberg, 1963)

Orden ***Trypanosomatida*** (Kent, 1880)

Familia ***Trypanosomatidae*** (Doflein, 1901)

Género *Leishmania* (Ross, 1903)

Para el género *Leishmania* se han descrito al menos 39 especies las cuales se distribuyen en tres subgéneros: *Leishmania* (*Leishmania*), *Leishmania* (*Viannia*) y *Leishmania* (*Sauroleishmania*). Las especies de los subgéneros *L.* (*Leishmania*) y *L.* (*Viannia*) afectan principalmente a vertebrados mamíferos tales como roedores, marsupiales, caninos y felinos, estos dos últimos son principalmente domésticos. Mientras que las especies del subgénero *L.* (*Sauroleishmania*) afectan a reptiles. Por lo que podemos decir que *Leishmania* es un tipo de parásito estenoxeno, con pocos hospederos definitivos, con un ciclo de vida heteroxeno (digenético) ya que requiere de un hospedero vector para continuar con su ciclo de vida. *Leishmania* es un organismo dimórfico ya que se conocen dos estadios morfológicos distintos del parásito. El promastigote que es una célula fusiforme con un único flagelo anterior y que se reproduce únicamente dentro del vector. Cabe mencionar que el sitio exacto en el que se desarrolla el parásito dentro del tubo digestivo del vector es determinante para establecer los subgéneros *L.* (*Leishmania*) y *L.* (*Viannia*) (Maurício, 2018, Melby et al., 2019; Steverding, 2017). Por otro lado, está el amastigote que es una célula ovoide claramente más pequeña que el promastigote con el flagelo retraído y que es visible solo con ayuda de un microscopio electrónico. El amastigote se reproduce también por fisión binaria, es estrictamente intracelular y se reproduce únicamente en el hospedero vertebrado definitivo (Bates et al., 1992).

1.2.1 *Leishmania mexicana*

Leishmania mexicana es un protozooario hemoflagelado del orden de los tripanosomátidos, que como ya se mencionó, es el principal agente etiológico de la leishmaniasis en México, cuyo estudio debe de ser de especial interés, pues entre otras cosas, es capaz de producir dos cuadros clínicos de la leishmaniasis cutánea, la localizada y la difusa.

Leishmania mexicana, al igual que todas las especies de *Leishmania*, tiene un ciclo de vida digenético, ya que requiere de dos hospederos para completar su ciclo de vida, el hospedero intermediario o vector y el hospedero definitivo. En el hospedero intermediario, o vector, se desarrolla la forma extracelular que consiste en una célula fusiforme con un único flagelo anterior. Este estadio morfológico es llamado promastigote procíclico, que se reproduce por fisión binaria en el tubo digestivo del vector. Posteriormente migra hacia la válvula estomodeal, donde se transforma en la forma infectiva, llamada promastigote

metacíclico, el cual se caracteriza por ser más pequeño, delgado y con un flagelo más largo comparado con el del promastigote procíclico. En el momento en el que el vector se alimenta del hospedero definitivo transmite los promastigotes metacíclicos, los cuales son fagocitados por las células del sistema inmune, entre otras. En la célula fagocítica u otra célula hospedera, el promastigote procíclico se aloja dentro del fagosoma para posteriormente transformarse en el segundo estadio morfológico llamado amastigote. El amastigote es una célula ovoide que, aunque posee flagelo, éste se encuentra retraído. El amastigote es mucho más pequeño que el promastigote, ya que mide entre 2-5 μm de diámetro, mientras que el promastigote mide 8-30 μm de largo. Dentro del fagosoma o vacuola parasitófora, el amastigote se reproduce intensivamente por fisión binaria, para posteriormente liberarse de la célula hospedera y así poder infectar células vecinas y perpetuar el ciclo de infección en el hospedero definitivo. El ciclo de vida se cierra cuando un vector no infectado se alimenta de un hospedero infectado (Figura 1) (Bates, 2007; Bates et al., 1992; Bates and Tetley, 1993; Sunter and Gull, 2017).

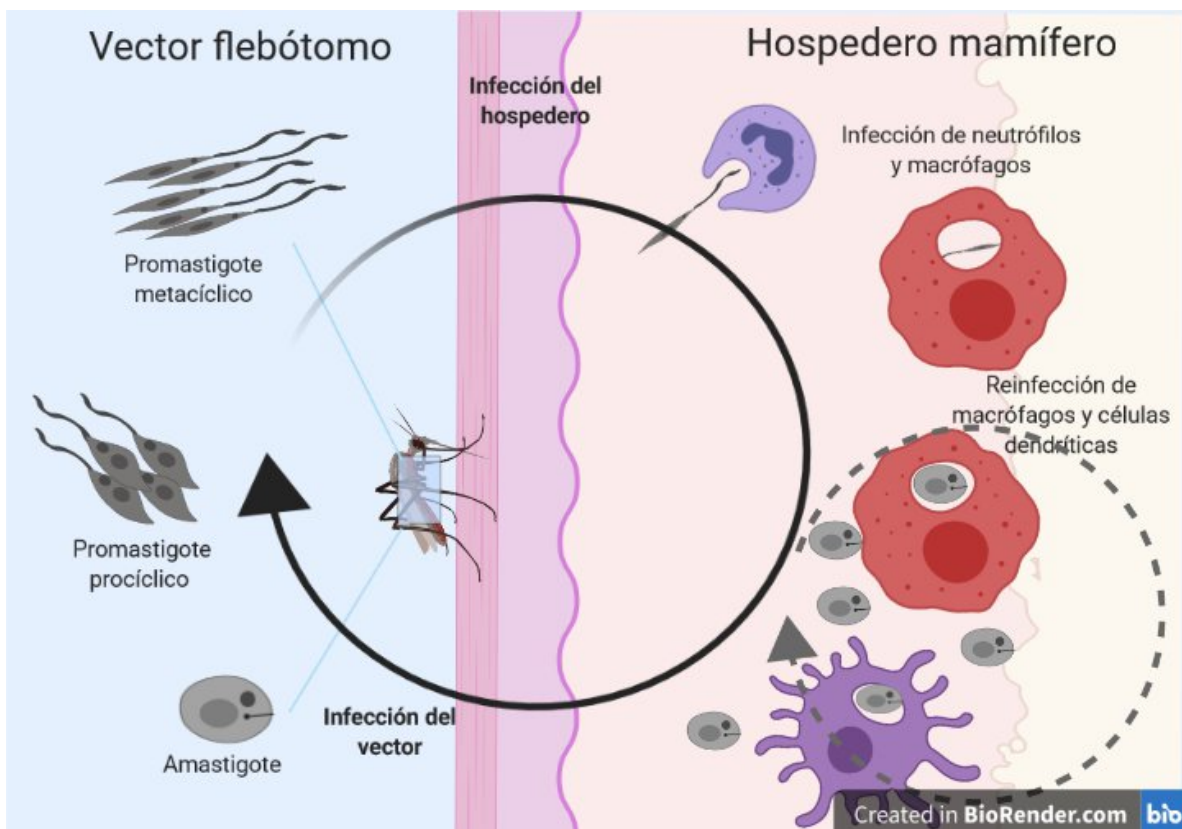


Figura 1. Ciclo de vida de *Leishmania*. El ciclo de vida se inicia cuando un vector hematófago infectado se alimenta de un hospedero sano inoculando promastigotes metacíclicos. Los promastigotes son fagocitados

rápidamente por neutrófilos y macrófagos principalmente. Dentro de los macrófagos, los promastigotes se transforman en amastigotes y comienzan a reproducirse. Los amastigotes se liberan de la célula hospedera y son fagocitados por las células vecinas, entre otras, las células dendríticas, de esta manera se perpetua el ciclo de infección y se establece la infección en el hospedero. El ciclo de vida se cierra cuando un vector hematófago se alimenta del hospedero infectado. En el intestino del vector los amastigotes se transforman en promastigotes procíclicos y maduran hasta transformarse en promastigotes metacíclicos. Creado con BioRender.com.

1.3 Respuesta inmune contra *Leishmania*

A partir del momento en el que el vector se alimenta del hospedero y transmite los promastigotes metacíclicos, se inicia la respuesta inmune en contra de *Leishmania* (Figura 2). La picadura que realiza el vector para alimentarse induce el reclutamiento de células del sistema inmune, principalmente neutrófilos y macrófagos (Bogdan and Röllinghoff, 1998). Por otro lado, se sabe que los promastigotes de *L. major* son fagocitados rápidamente por los macrófagos a través del receptor 3 del complemento (Mosser and Edelson, 1985) y de esta manera se evita la activación de los mecanismos microbicidas del macrófago. Además, se previene la producción de la interleucina 12 (IL-12) (Schönlau et al., 2000). Los promastigotes fagocitados por los macrófagos se transforman en amastigotes dentro de las vacuolas parasitóforas gracias a que el parásito evita los mecanismos microbicidas del macrófago. El amastigote dentro de la vacuola parasitófora comienza una serie de intensas divisiones celulares hasta que se libera al medio extracelular. Ahí, es fagocitado por células vecinas como las células dendríticas (DC). Las DC, a diferencia de los macrófagos, fagocitan a *L. major* a través de los receptores I y III para la inmunoglobulina G (Fc γ RI y Fc γ RIII), lo que promueve la maduración de las DC, la migración a los nódulos linfáticos y de manera muy importante la producción de IL-12, la cual los macrófagos no logran producir (Woelbing et al., 2006). La maduración de las DC infectadas con el parásito se caracteriza por cambios fenotípicos tales como el incremento en los niveles de expresión de las moléculas CD40, CD54, CD80, CD86, el complejo mayor de histocompatibilidad II (MHC-II), lo que permite que activen de manera eficiente a los linfocitos T vírgenes (von Stebut et al., 1998). Las DC activan a los linfocitos T vírgenes, principalmente en los nódulos linfáticos, donde se encuentran tanto con linfocitos T CD4⁺ como con los T CD8⁺ produciendo una respuesta inmune especie específica en contra del parásito dominada por la presencia del interferón gama (INF- γ) y linfocitos T citotóxicos (Tc). Esta respuesta se ha denominado respuesta inmune Th1/Tc1, la cual permite que el ratón resuelva la infección (von Stebut, 2016).

1.3.1 Interacción de *Leishmania* con las células dendríticas

La participación de las DC es de vital importancia para el control de la leishmaniasis, ya que como fue mencionado anteriormente, son necesarias para iniciar la respuesta inmune adaptativa Th1/Tc1. Se ha demostrado que la interacción de las DC con *Leishmania* varía entre diferentes especies del parásito. Un ejemplo de esto es lo observado con *L. mexicana* y *L. major*. Las DC que fagocitan parásitos de *L. major* maduran y producen IL-12, mientras que las que fagocitan parásitos de *L. mexicana* ni maduran ni producen IL-12. Cabe acotar que, de manera muy interesante, las DC infectadas con *L. mexicana* no pierden la capacidad de producir IL-12, ya que al coestimular con LPS se logra inducir la producción y secreción de esta citocina. Por otro lado, los macrófagos pierden la capacidad de producir IL-12, aun cuando son coestimulados con LPS (Bennett et al., 2001). Otra observación interesante es la participación de diferentes receptores durante la fagocitosis de varias especies de *Leishmania* por las DC. Durante la fagocitosis de *L. mexicana* por las DC participa principalmente el receptor de lectinas tipo C (DC-SIGN), probablemente a través del reconocimiento del lipofosfoliglicano (LPG) que ese encuentra en la superficie del parásito (Appelmek et al., 2003), ya que al bloquear DC-SIGN, la interacción de las DC con *L. mexicana* o con *L. pifanoi* disminuye significativamente (Argueta-Donohué et al., 2016; Colmenares et al., 2002). Además, DC-SIGN se une con mayor avidéz tanto a los amastigotes, como a los promastigotes metacíclicos, ambos estadios infectivos, aunque, independientemente de la presencia del LPG. Sin embargo, durante la interacción de las DC con los promastigotes metacíclicos de *L. major* no participa DC-SIGN (Colmenares et al., 2004). Falta mayor investigación en este campo para conocer todos los receptores involucrados en la fagocitosis de *Leishmania* por las DC y las diferencias que existen entre las distintas especies.

En relación con la expresión de las moléculas involucradas en la presentación antigénica se sabe que existen diferencias entre distintas especies de *Leishmania*. Contrario a lo que ocurre durante la infección de las DC con *L. major*, la infección de las DC con *L. mexicana* reduce la expresión de las moléculas coestimuladoras y las presentadoras de antígenos, es decir inhibe la maduración de las DC, lo que ha sido relacionado con el aumento de la actividad de las fosfatasa de tirosina, la inactivación de la vía de señalización de las MAPK, además del decremento en la translocación de los factores de transcripción AP-1 y NFκB (Contreras et al., 2014). Además, en las DC infectadas con *L. mexicana* disminuye la

capacidad migratoria, junto con la síntesis de la sintasa inducible del óxido nítrico (NOS2), lo que finalmente se traduce en la progresión de la enfermedad en los ratones infectados (Petritus et al., 2012). No solo se reduce la NOS2 si no también la producción de óxido nítrico en las DC infectadas con *L. mexicana* (Wilkins-Rodríguez et al., 2010).

Existen distintas subpoblaciones de DC y según el tipo de subpoblación infectada varía el tipo de respuesta inmune. Por ejemplo, las DC plasmacitoides no logran fagocitar los promastigotes de *L. infantum*, sin embargo, se induce la liberación de INF- α/β , pero no de IL-12 (Schleicher et al., 2007). Por otro lado, las células de Langerhans infectadas con *L. major* activan a los linfocitos T reguladores, lo que se traduce en la supresión de la respuesta inmune necesaria para el control de la infección (Kautz-Neu et al., 2011). Por otro lado, al eliminar a la subpoblación de DC CD103⁺ en ratones infectados con *L. major* se observa un incremento de los linfocitos T reguladores junto con una respuesta inmune Th2, lo que sugiere que las DC CD103⁺ son las principales células responsables de la respuesta inmune necesaria para el control de la infección (Martínez-López et al., 2015).

Resumiendo, *Leishmania* modula diversos procesos biológicos en las DC tales como la maduración, la migración y la producción de citocinas, lo que finalmente le permite evadir la respuesta inmune del hospedero y establecerse exitosamente. Una de las estrategias del sistema inmune para eliminar al parásito es la inducción de la apoptosis de las células infectadas a través de los linfocitos T citotóxicos. Probablemente, para evadir la respuesta de los linfocitos Tc1 *Leishmania* logra inhibir o retrasar la apoptosis de las células hospederas, entre ellas las DC, sin importar si la infección de las células se inicia con promastigotes o con amastigotes (Gutiérrez-Kobeh et al., 2013; Valdés-Reyes et al., 2009).

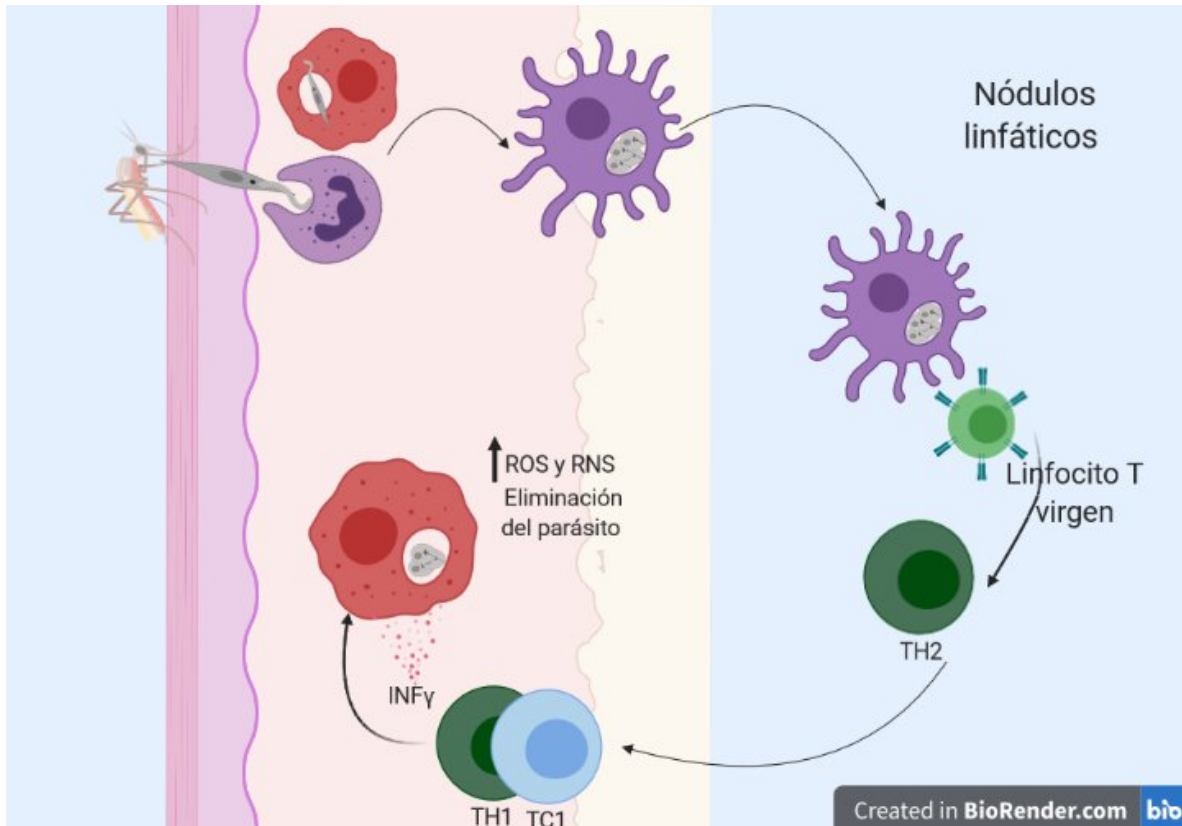


Figura 2. Respuesta inmune en contra de *Leishmania*. Una vez que los promastigotes metacíclicos son fagocitados por las células del sistema inmune, principalmente macrófagos, se transforman en amastigotes y se reproducen. Posteriormente se liberan y son fagocitados por otras células vecinas, como las células dendríticas. Cuando las DC fagocitan a los amastigotes, éstas comienzan el proceso de maduración y viajan a los nódulos linfáticos, donde activan a linfocitos T vírgenes iniciando la respuesta inmune Th1/Tc1 específica contra *Leishmania*. Creado con BioRender.com.

1.4 La apoptosis

La apoptosis es un tipo de muerte celular programada, aunque existen otros tipos como la necrosis, la piroptosis, la necroptosis, et. La apoptosis se ha descrito clásicamente a través de marcadores morfológicos tales como la condensación de la cromatina, el encogimiento del citoplasma, la formación y separación de los cuerpos apoptóticos y que además no produce inflamación (Figura 3). Sin embargo, el Comité de Nomenclatura de Muerte Celular ha señalado que la caracterización de la apoptosis (junto con todo tipo de muerte celular) debe hacerse con base en parámetros bioquímicos cuantificables y no en términos de los parámetros morfológicos (Galluzzi et al., 2014).

La apoptosis se puede dividir en dos fases, la fase iniciadora en la que se activan los genes y las vías de señalización necesarias para llevar a cabo la apoptosis. La segunda fase es

la fase ejecutora, en la que intervienen las peptidasas específicas de aspartato, dependientes de cisteína (caspasas) ejecutoras 3, 6 y 7, que, a su vez, son activadas por las caspasas iniciadoras 2, 8, 9 y 10. Las caspasas ejecutoras son las enzimas encargadas de dismantelar a la célula y provocar los cambios morfológicos característicos de la apoptosis (Taylor et al., 2008). Para las caspasas ejecutoras se conocen al menos mil sustratos diferentes, entre los que destacan proteínas involucradas en la reparación del DNA, como la polimerasa de poli-ADP ribosa (PARP), proteínas reguladoras del ciclo celular como p21, la ligasa de ubiquitina E3, el inhibidor de la DNAsa activada por caspasas (ICAD) y proteínas estructurales como la actina. Las caspasas ejecutoras también pueden degradar la subunidad p75 del complejo I mitocondrial lo que resulta en la interrupción de la cadena de transporte de electrones y por lo tanto en el cese de la producción de ATP (Green & Llambi, 2015).

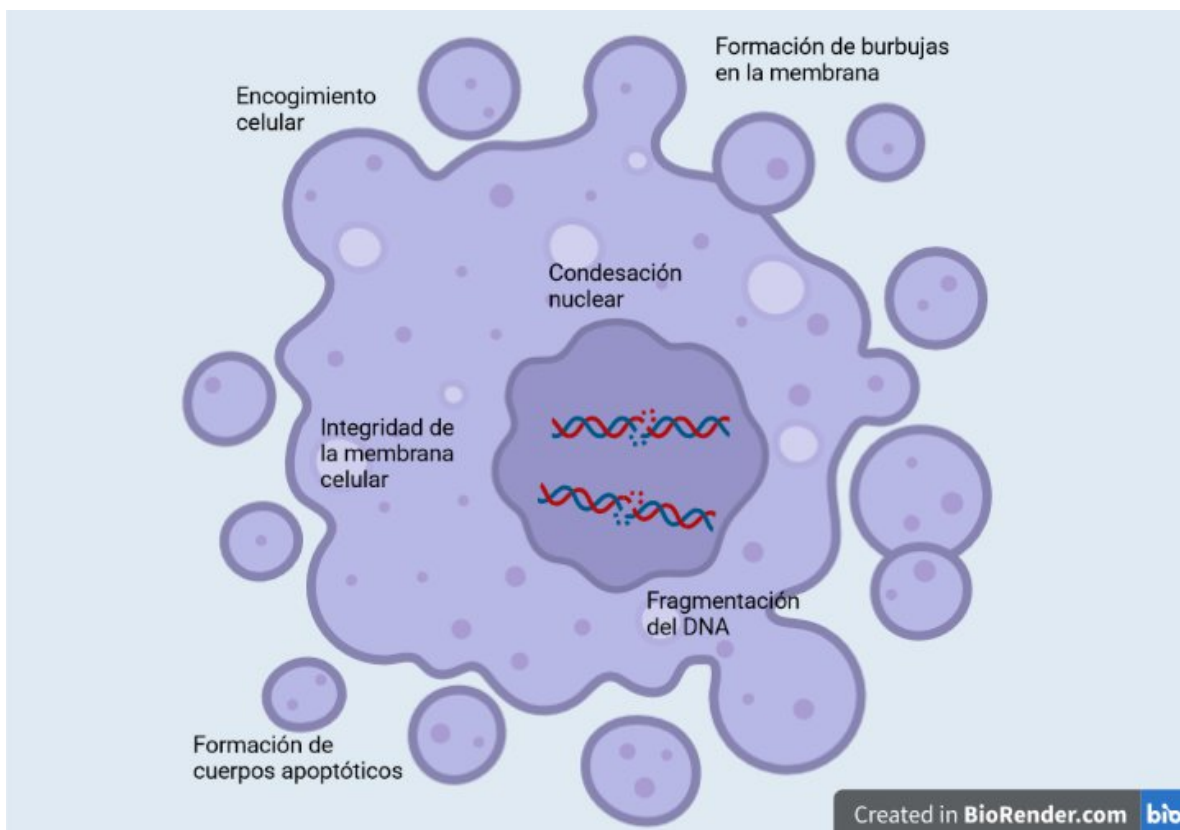


Figura 3. Características principales de una célula apoptótica. Las células apoptóticas presentan cambios morfológicos distintivos como son la formación de burbujas en la membrana celular (blebbing), el encogimiento celular, la condensación nuclear, la fragmentación del DNA, la translocación de la fosfatidilserina y la formación de cuerpos apoptóticos. además, se mantiene la integridad de la membrana celular, aun en los cuerpos apoptóticos. Creado con BioRender.com.

1.4.1 Vías de inducción de la apoptosis

La apoptosis se ha dividido de acuerdo con la forma de inducción en tres vías: (1) la vía extrínseca o activada por receptores, (2) la vía perforina/granzima y (3) la vía intrínseca o mitocondrial (Figura 4).

La vía extrínseca es activada por procesos extracelulares a través de ligandos solubles que se unen a receptores asociados con dominios de muerte, como por ejemplo Fas/FasL. La vía perforina/granzima es iniciada en células citotóxicas del sistema inmune, como por ejemplo células NK y linfocitos T citotóxicos. La vía intrínseca es activada por procesos intracelulares tales como el daño al DNA o la acumulación de proteínas mal plegadas y depende en gran medida de la actividad de la mitocondria. Sin embargo, dividir la apoptosis según la manera en que es iniciada es algo puramente didáctico, ya que las vías no son mutuamente excluyentes y se pueden activar unas a otras a través de circuitos de retroalimentación positiva. Además, todas las vías convergen en la fase ejecutora, la cual es iniciada con la activación de la procaspasa 3 y tiene como resultado final la fragmentación del DNA, la degradación de proteínas nucleares y del citoesqueleto, la expresión de ligandos para receptores de células fagocíticas, formación de los cuerpos apoptóticos y finalmente la fagocitosis por células vecinas (Elmore, 2007).

1.4.1.1 La vía extrínseca

La vía extrínseca es iniciada por los receptores que son codificados por genes de la superfamilia de los receptores del factor de necrosis tumoral (TNFR) (Figura 4). Los miembros de esta familia de receptores se caracterizan por un dominio intracelular de aproximadamente 80 residuos de aminoácidos llamado el dominio de muerte (DD). Los mejor estudiados son el receptor de Fas y su ligando FasL (FasR/FasL), el receptor para el factor de necrosis tumoral 1 y su ligando el TNF- α (TNF- α /TNFR1). Se conocen también Apo3L/DR3, TRAIL/TRAILR y los receptores de netrina (UNC5A-D), aunque estos últimos sólo inducen la apoptosis cuando la concentración específica del ligando cae por debajo de un punto crítico (Elmore, 2007; Galluzzi et al., 2012).

La vía extrínseca de la apoptosis se puede iniciar cuando FasL se une a su receptor FasR. La unión del receptor de Fas con su ligando provoca la formación de un homotrímero estable de FasR, lo que a su vez induce el reclutamiento de FADD del lado intracelular,

gracias a la interacción de los DD de ambas proteínas. Luego, FADD se asocia con las procaspasas iniciadoras 8 o 10, generalmente la 8, a través del dominio efector de muerte (DED), lo que permite la autoactivación de las procaspasas iniciadoras. Las caspasas iniciadoras activas tienen como sustrato principal a las procaspasas ejecutoras, 3, 6 y 7, generalmente a la 3. Finalmente, las caspasas ejecutoras activas se encargan de dismantelar a la célula. Aunque, la caspasa 8 puede también activar directamente a Bid y formar tBid y de esta manera iniciar la vía intrínseca de la apoptosis (Elmore, 2007; Green & Llambi, 2015; Redza-Dutordoir & Averill-Bates, 2016)

Otro de los mecanismos a través del cual se inicia la vía extrínseca y que se ha estudiado ampliamente es el de TNF- α /TNFR. Cuando TNF- α se une al receptor TNFR se induce la formación y estabilización del homotrímero de TNFR. Este evento provoca el reclutamiento de la proteína asociada a TNFR con dominio de muerte (TRADD). En seguida, TRADD recluta tanto a RIP como a TRAF, formando el llamado complejo I (Green & Llambi, 2015). Además, TRAF2 puede reclutar también a las proteínas inhibidoras de la apoptosis (c-IAP) 1 y 2 (Rothe et al., 1995). Las c-IAP 1/2 ubiquitinizan a la cinasa RIP, lo que permite que se active la vía de señalización de NF- κ B y la célula sobreviva (Varfolomeev et al., 2008), mientras que al inhibir a las c-IAP 1/2 se induce la apoptosis de la célula ya que se inhibe la ubiquitinización de RIP, lo que permite que el complejo TRADD-RIP (complejo II) se libere de TNFR. Una vez en el citosol, el complejo II recluta a FADD que a su vez recluta a la procaspasa 8 lo que resulta en la activación de esta, para posteriormente activar a las procaspasas ejecutoras (Elmore, 2007; Green & Llambi, 2015; Redza-Dutordoir & Averill-Bates, 2016).

1.4.1.2 La vía perforina/granzima

La vía perforina/granzima es iniciada en células citotóxicas del sistema inmune, como por ejemplo las células NK, las cuales se encargan de eliminar células tumorales o infectadas por virus, bacterias o parásitos intracelulares (Figura 4). Una vez que la célula citotóxica identifica a la célula blanco, secreta la perforina que se une a la membrana de la célula blanco y forma poros a través de los cuales vierte al interior gránulos que contienen proteasas de residuos de serina llamadas granzimas A y B. La granzima A inicia la apoptosis de manera independiente a las caspasas, ya que degrada al complejo de proteínas del nucleosoma llamado SET, el cual se encarga de inhibir el gen *NM23-H1*, lo que inicia la síntesis de la DNAsa NM23-H1. La granzima B puede iniciar la apoptosis

cortando y activando directamente a la procaspasa 3; puede también activar a la procaspasa 10 e iniciar la cascada de activación de las caspasas hasta llegar a las caspasas ejecutoras (3, 6 y 7) y finalmente puede también degradar al inhibidor de la DNAsa activada por caspasas (ICAD). De manera interesante, la granzima B puede cortar a Bid para formar tBid e iniciar la vía intrínseca de la apoptosis (Elmore, 2007).

1.4.1.3 La vía intrínseca

La vía intrínseca o mitocondrial es iniciada por estrés celular, cuyo origen puede ser de diferentes fuentes tales como daño al DNA, estrés oxidativo, acumulación de proteínas mal plegadas en el retículo endoplásmico, radiación, hipoxia, privación de nutrientes, etc. (Figura 4). Sin importar que origen tenga el estímulo, en esta vía se conduce a la permeabilización de la membrana externa de la mitocondria (MOMP), la cual puede ser originada por la acción de las proteínas proapoptóticas Bak y Bax que se polimerizan en la membrana externa de la mitocondria para formar poros. Una vez que ocurre la MOMP, ésta constituye un punto de no retorno durante el proceso apoptótico, ya que ocurren múltiples procesos letales para la célula tales como: (1) la disipación del potencial de membrana con la consecuente desaparición de la síntesis de ATP y los sistemas de transporte activo, (2) la liberación de proteínas tóxicas desde el espacio intermembranal de la mitocondria hacia el citoplasma tales como el citocromo C, el factor inductor de apoptosis (AIF), la endonucleasa G (EndoG), la proteína de unión directa a IAP con bajo punto isoeléctrico (DIABLO), llamada también segundo activador de caspasas derivado de la mitocondria (SMAC), la proteína con requerimiento de temperatura elevada A2 (HTRA2) y (3) la inhibición de la cadena respiratoria. En el citoplasma el citocromo C se une a la proteína adaptadora Apaf-1 y la activa, lo que induce el reclutamiento de la procaspasa 9 y la formación de un complejo multiproteínico denominado apoptosoma, a través del cual la procaspasa 9 se activa por autoproteólisis, lo que a su vez activa a la procaspasa 3 iniciando la fase ejecutora de la apoptosis (Galluzzi et al., 2012).

Por otro lado, AIF y EndoG se translocan al núcleo celular donde inician la fragmentación del DNA en fracciones de 50-300 kb llevando a cabo la apoptosis de manera independiente de las caspasas. Por otro lado, las proteínas SAMAC/DIABLO y HTRA2 se encargan de inhibir las funciones antiapoptóticas de la familia de proteínas inhibidoras de la apoptosis (IAP). Además, HTRA2 tiene actividad de proteasa de residuos de serina, lo que contribuye

a la fase ejecutora de la apoptosis de manera independiente a las caspasas (Elmore, 2007; Galluzzi et al., 2012).

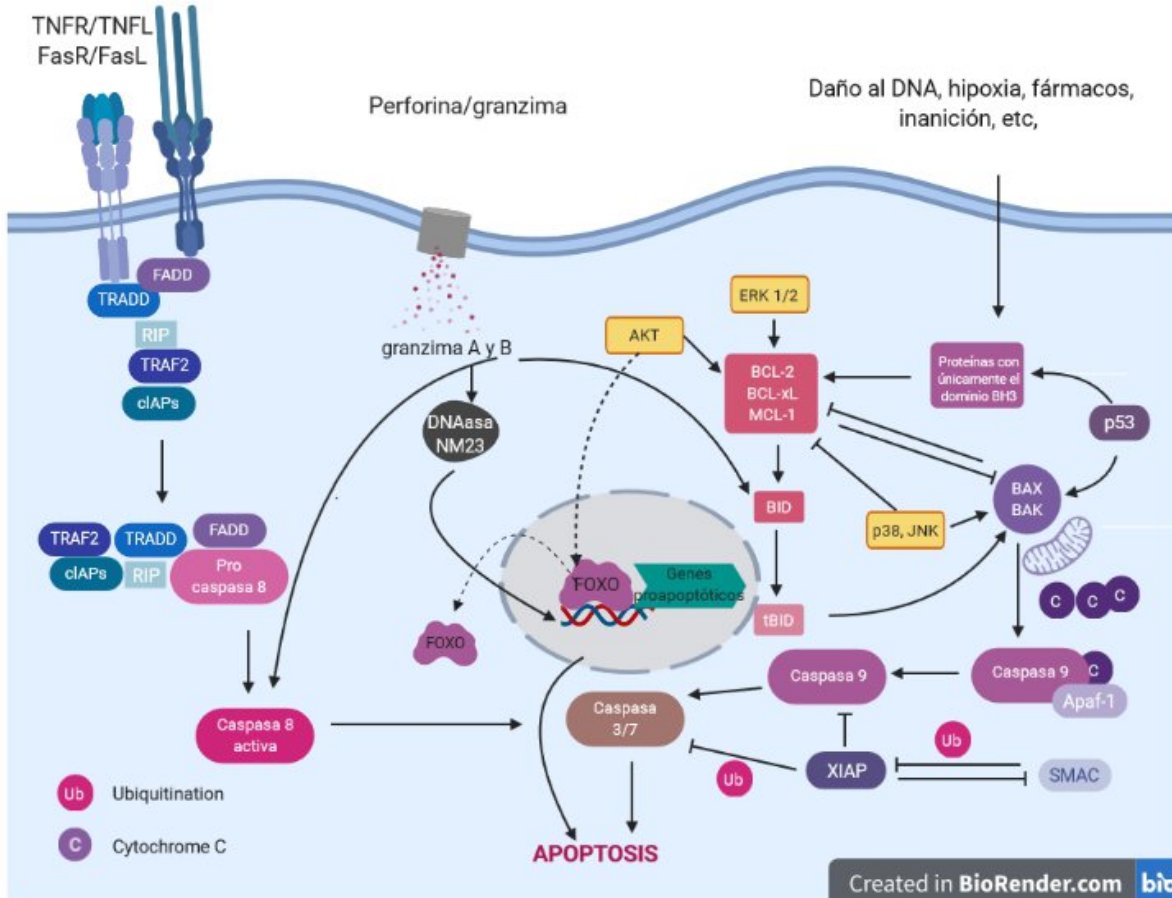


Figura 4. Vías de activación de la apoptosis. La activación de la apoptosis se inicia a través de tres vías principalmente. La vía de extrínseca o de los receptores se inicia por la unión de un receptor de muerte con su ligando, lo que induce cambios conformacionales que favorecen la formación del complejos proteínicos para activar a la caspasa 8 iniciadora y finalmente a la caspasa 3 ejecutora. La vía intrínseca se inicia por distintos estímulos endógenos tales como la falta de nutrientes, hipoxia, fármacos, daño al DNA, lo que induce la MOMP y con ello la liberación del citocromo C, Apaf-1, SMAC, con lo cual se forma el apoptosoma y se activa la caspasa 9 iniciadora y esta finalmente activa a la caspasa 3 ejecutora. La vía perforina/granzima se inicia con la formación poros en las células blanco, lo cual sucede gracias a la perforina, posteriormente se vierten las granzimas. Las granzimas activan a las caspasas iniciadoras, como la 9, activan endonucleasas y también pueden iniciar la vía extrínseca a través de la formación de tBid. Creado con BioRender.com.

1.4.2 Proteínas que regulan la MOMP

El punto de no retorno durante la apoptosis es la permeabilización de la membrana externa de la mitocondria (MOMP) y este punto está altamente regulado por proteínas con dominios de homología BH de la familia de Bcl-2 (linfoma de células B 2). Esta familia está formada por tres grupos principales: las proteínas antiapoptóticas, que contienen los dominios de

homología BH1, BH2, BH3 y BH4, tales como Bcl-2, Bcl-xL, MCL-1, Bfl-1, entre otras. Las proteínas proapoptóticas que contienen los dominios de homología BH1, BH2 y BH3, tales como Bax y Bak y que además son las proteínas encargadas de iniciar la MOMP, ya que se translocan a la membrana externa mitocondrial y forman poros a través de los cuales se libera al citoplasma el citocromo C y Apaf-1, entre otros. Por último, las proteínas proapoptóticas que contienen únicamente el dominio de homología BH3 tales como Bad, Bid, Bik, Bmf, PUMA, NOXA, Hrk, etcétera, las cuales se encargan de identificar las señales apoptóticas y de activar o inhibir a Bax/Bak y a las proteínas antiapoptóticas como Bcl-2 (Galluzzi et al., 2012). La caspasa 8 y la granzima B pueden cortar a Bid y formar Bid truncado a través del cual la vía perforina/granzima y la vía extrínseca son amplificadas por la vía intrínseca (Dai et al., 2016; Kollek et al., 2016). El delicado balance entre las proteínas proapoptóticas y antiapoptóticas puede determinar el destino de las células de tal manera que un aumento de las proteínas antiapoptóticas puede inhibir la apoptosis o viceversa (Kale et al., 2018).

1.5 Vías de señalización durante la apoptosis

Tanto en la fase iniciadora como en la fase ejecutora de la apoptosis hay proteínas que regulan cada paso del proceso, como por ejemplo las proteínas inhibidoras de las caspasas, las proteínas de la familia Bcl-2, sin embargo, existe otro nivel más de regulación y éste ocurre a nivel de las vías de transducción de señales.

1.5.1 Vía de señalización de las MAPK durante la apoptosis

Una de las principales vías de transducción de señales que participa en la regulación de la apoptosis es la vía de las proteínas cinasas activadas por mitógenos (MAPK). Las MAPK son una familia de cinasas que fosforilan específicamente residuos de serina/treonina y que, además de regular la apoptosis, participan también en otros procesos celulares tales como la proliferación, la diferenciación, la inflamación, etc. La familia de las MAPK está compuesta por al menos tres miembros, las cinasas ERK, las cinasas JNK y las cinasas p38, cada grupo con diversas isoformas. Las cinasas JNK pueden fosforilar tanto para activar o inhibir proteínas proapoptóticas o antiapoptóticas. Por ejemplo, JNK puede fosforilar a Bcl-2 y Bcl-xL inactivándolas y por otro lado puede fosforilar a Bad, lo que induce que se disocie de Bcl-xL y se favorezca la apoptosis (Fig.4). La cinasa p38, de manera muy similar a JNK, fosforila proteínas tanto para activarlas como para inactivarlas. Por ejemplo,

fosforila a Bad, Bax y Bim, lo que resulta en la activación de éstas y favorece la inducción de la apoptosis (Cho and Choi, 2002; Jin and El-Deiry, 2005).

1.5.2 Vía de señalización de Akt durante la apoptosis

La vía de señalización de Akt participa principalmente en la diferenciación celular, la proliferación y el metabolismo, sin embargo, participa también regulando negativamente la apoptosis. Akt es una proteína cinasa que fosforila residuos de serina o treonina y que en mamíferos se conocen tres isoformas Akt1, Akt2 y Akt3. La vía canónica de activación de Akt se inicia con la activación de receptores acoplados a cinasas de tirosina (RTK) o receptores acoplados a proteínas G (GPCR) (Figura 5). Tanto los RTK como los GPCR reclutan y activan a las cinasas de fosfoinosítido 3 (PI3K), las cuales se encargan de fosforilar al fosfatidilinositol-4,5P₂ (PIP2) produciendo fosfatidilinositol-3,4,5P₃ (PIP3). Esto permite que el PIP3 reclute a Akt y se unan a través del dominio de homología de plectrina, el cual posee Akt. Esto facilita que la proteína cinasa dependiente de fosfoinosítido 1 (PDK1) fosforile a Akt en el residuo treonina 308, mientras que mTORC2 lo hace en el residuo de serina 473 y de esta manera se logra la activación completa de Akt (Manning and Toker, 2017; Zhang et al., 2011).

La vía de señalización de Akt modula la apoptosis, principalmente, a través de la inactivación de proteínas proapoptóticas y la inducción de genes antiapoptóticos. La fosforilación de Bad por Akt induce la unión con la proteína 14-3-3, lo que a su vez promueve que Bad sea degradado por la vía del proteasoma. Akt activa a los factores de transcripción CREB y NFκB los cuales regulan la expresión de genes antiapoptóticos tales como genes de la familia de Bcl-2 y genes de las IAP. GSK3 es una cinasa que se encuentra activa constitutivamente en ausencia de señales exógenas y fosforila diferentes sustratos para que sean degradados por la vía del proteasoma. Sin embargo, cuando Akt es activada induce la inactivación de GSK3, lo que permite que se establezca la concentración intracelular de proteínas antiapoptóticas como Mcl-1, junto con factores de transcripción como c-Myc, el cual interviene en la expresión de genes antiapoptóticos. FOXO es un factor de transcripción que ante la falta de un estímulo exógeno se encuentra en el núcleo induciendo la síntesis de genes proapoptóticos tales como PUMA, Bim, TRAIL, FasL, entre otros. Sin embargo, cuando Akt es activada fosforila a FOXO, lo que induce que salga del núcleo al citosol para que sea reconocido por la proteína 14-3-3 y finalmente sea degradado por la vía del proteasoma (Cho and Choi, 2002; Jin and El-Deiry, 2005; Manning and Toker,

2017; Zhang et al., 2011) (Figura 5). De esta manera Akt permite que, dentro de la familia de las proteínas Bcl-2, la balanza se mantenga a favor del lado antiapoptótico, induciendo la degradación de proteínas proapoptóticas e induciendo la expresión de genes antiapoptóticos.

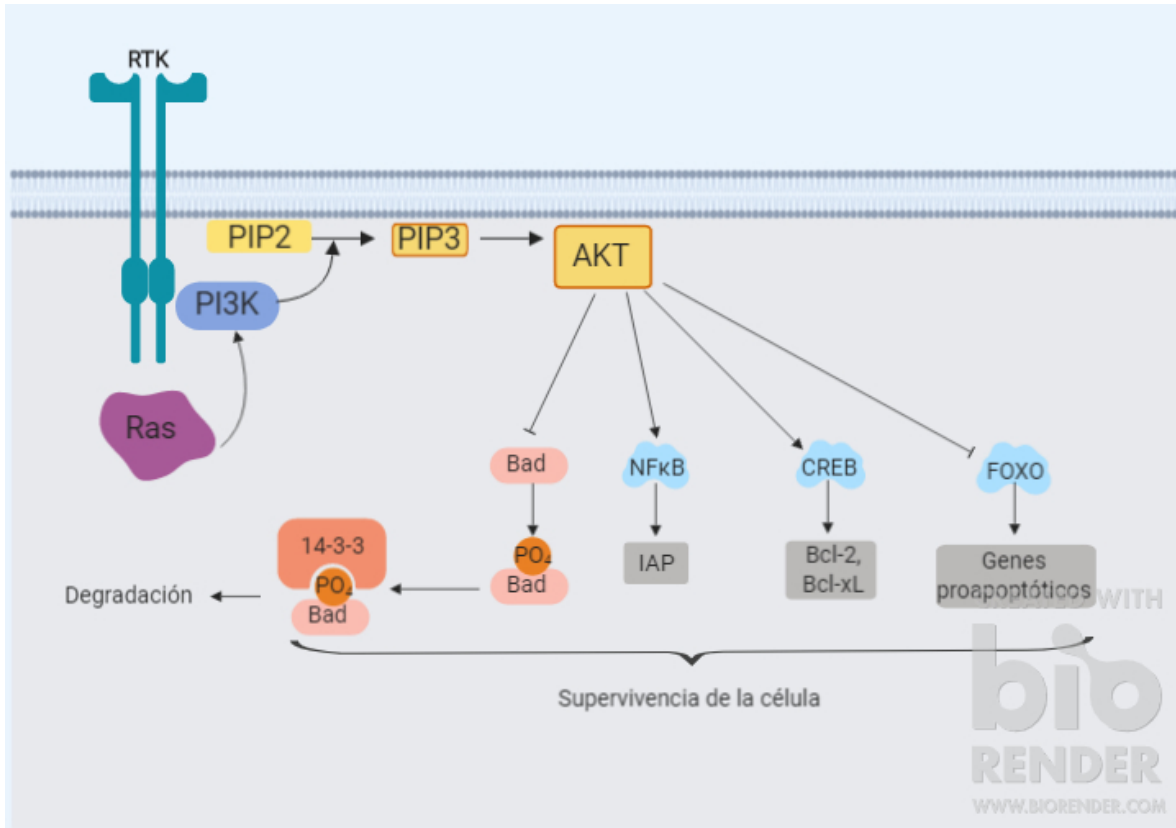


Figura 5. Vía canónica de transducción de señales de Akt. La vía canónica de transducción de señales de Akt se inicia con la activación de un RTK o un GPCR, lo que induce cambios conformacionales que favorecen la activación de PI3K. PI3K forma PIP3 y éste recluta a Akt, lo que facilita que Akt sea fosforilado por PDK1 y por mTORC2 y de esta manera se logra la activación completa de Akt. Akt activo puede fosforilar distintos sustratos tales como Bad, CREB, FOXO, lo que en conjunto resulta en la supervivencia de la célula. Creado con BioRender.com.

1.6 Modulación de la apoptosis por *Leishmania*

Leishmania al ser un parásito intracelular obligado depende de que la célula hospedera permanezca viva mientras se reproduce dentro de la vacuola parasitófora, por lo tanto, durante su historia evolutiva se produjeron adaptaciones que le permitieron inhibir o retrasar la apoptosis de la célula hospedera. Moore y Mathlshewski en 1994 reportaron por primera vez que en los macrófagos infectados con promastigotes o tratados con LPG de *L. donovani* se inhibe la apoptosis producida por la ausencia del factor estimulante de colonias de

macrófagos (M-CSF). Además, al tratar a los macrófagos con el LPG del parásito se inhibe también la apoptosis inducida por falta de M-CSF. Por otro lado, al colocar el sobrenadante colectado de los macrófagos infectados lograron inhibir la apoptosis en macrófagos no infectados, lo que sugiere la presencia de un factor soluble producido por los macrófagos infectados o por el propio parásito (Moore et al., 1994).

Posteriormente se demostró que la infección de neutrófilos, cuya vida media es de 6-10 horas en el torrente sanguíneo y después mueren por apoptosis, con *L. major* se inhibe la apoptosis espontánea. De manera interesante, al matar a los promastigotes con etanol o usar lisados el efecto antiapoptótico no se observa, por lo que solo los parásitos viables son capaces de inhibir la apoptosis. Además, contrario a lo reportado anteriormente, el sobrenadante colectado de los neutrófilos infectados no logra inhibir la apoptosis de los neutrófilos no infectados, lo que le quita peso a la hipótesis del factor soluble como efector en la inhibición de la apoptosis y abre la puerta a un factor no soluble que posiblemente se encuentra en la superficie del parásito. Además, se determinó que la infección de los neutrófilos no bloquea la inducción de la apoptosis, sino que la retrasa aproximadamente durante 24 horas, lo que permite la célula muera por apoptosis y los parásitos sean liberados dentro de los cuerpos apoptóticos (Aga et al., 2002).

Posteriormente se demostró que la infección con promastigotes de *L. major* de macrófagos de ratones tanto resistentes como susceptibles a esta especie de *Leishmania* inhibe la apoptosis inducida por falta de M-CSF o con estaurosporina, lo que demuestra que la inhibición de la apoptosis en las células infectadas es independiente de la susceptibilidad del hospedero a la enfermedad y del estímulo apoptótico. Se observó que en los macrófagos infectados se previene la activación de la caspasa 3 asociada con una disminución de la MOMP y con la liberación sucesiva del citocromo C. Por otro lado, el uso de inhibidores específicos de NF κ B mantiene la inhibición de la apoptosis en los macrófagos infectados, lo que sugiere que este factor de transcripción ni los genes que regula son indispensables para que el parásito logre inhibir la apoptosis de la célula hospedera (Akarid et al., 2004).

En monocitos humanos de la línea celular U937 infectados con promastigotes de *L. infantum* se demostró que se inhibe la apoptosis inducida con actinomicina D. No sólo en los monocitos infectados y tratados con la actinomicina D se inhibe la apoptosis, sino

también en los monocitos tratados con LPG del parásito o con el sobrenadante del cultivo de los parásitos, sin embargo, al utilizar un anticuerpo neutralizante en contra del LPG del parásito se logra inducir la apoptosis en los monocitos (Lisi et al., 2005). Estos resultados junto con los de Moore y Mathlashewski sugieren que LPG desempeña un papel importante durante la inhibición de la apoptosis de la célula hospedera.

Por otro lado, en macrófagos infectados con distintas especies de *Leishmania* se observó que se induce la activación de al menos dos vías de transducción de señales, la vía de la MAPK p38 y la vía de Akt. De manera interesante al silenciar la expresión del gen de Akt o al usar inhibidores específicos se logró inducir la apoptosis en los macrófagos infectados en presencia de distintos inductores de la apoptosis. Esto sugiere la importancia de la activación de la vía de Akt para que se logre inhibir la apoptosis. Más aun, se observó que en los macrófagos infectados Bad se encuentra fosforilado, mientras que al inhibir o silenciar a Akt, se revierte la fosforilación de Bad (Ruhland et al., 2007). Como ya se mencionó, la fosforilación de Bad por Akt es necesaria para que Bad sea degradado por la vía del proteasoma, lo que ayuda a mantener un balance antiapoptótico. Estos resultados permiten vislumbrar la importancia de la vía de Akt.

En otro estudio, se observó que distintas cepas de *L. major* pueden tener distintos efectos en la inhibición de la apoptosis de la célula hospedera. Al infectar macrófagos de ratón con cepas de *L. major* o de *L. donovani* poco virulentas se inhibe la apoptosis inducida con ciclohexamida en hasta un 95%, mientras que al infectar a los macrófagos con cepas altamente virulentas se disminuye en apenas un 25%, lo que sugiere que las cepas altamente virulentas no inhiben la apoptosis tan eficientemente como las cepas poco virulentas. De manera muy interesante se observó que al infectar macrófagos con parásitos modificados genéticamente que carecen del LPG se inhibe la apoptosis inducida con la ciclohexamida, por lo que, en este caso la inhibición de la apoptosis no depende la presencia del LPG. Además, se determinó que el contacto directo de los parásitos con las células hospederas es necesario para la inhibición de la apoptosis, ya que al limitar el contacto de los parásitos con los macrófagos a través de una membrana con poro de 0.4 μ M se logra inducir la apoptosis de los macrófagos. Estos resultados, junto con los de Aga et al, 2002, demuestran que el LPG no es necesario para la inhibición de la apoptosis, pero sí es necesario el contacto de los parásitos con la célula hospedera. Por último, se observó también que durante la inhibición de la apoptosis inducida con ciclohexamida en los

macrófagos infectados se induce un incremento en la presencia proteínica de Bcl-xL (Donovan et al., 2009). Esto sugiere que la modulación de la MOMP a través de las proteínas de la familia Bcl-2 es importante durante la inhibición de la apoptosis en las células infectadas con *Leishmania*.

En neutrófilos humanos infectados con *L. major* se induce la activación de la vía de transducción de señales de las MAPK, principalmente de ERK 1/2 y de p38. Al inhibir específicamente a ERK se induce la apoptosis en los neutrófilos, pero no sucede lo mismo al inhibir específicamente la vía de p38. Además, en los neutrófilos infectados se mantiene la expresión de la proteína antiapoptótica Bcl-1, mientras que se incrementa la presencia de Bcl-2 y se inhibe la formación de tBid, o que se asoció con la disminución en la liberación del citocromo C y la activación de la caspasa ejecutora 6 (Sarkar et al., 2013). Esto sugiere, nuevamente, que la modulación de la MOMP a través de la regulación de las proteínas de la familia de Bcl-2 para mantener un balance antiapoptótico es determinante en la inhibición de la apoptosis de las células hospederas infectadas con *Leishmania*.

Nuestro grupo de trabajo es el único en el mundo que estudia la inhibición de la apoptosis en las células dendríticas humanas infectadas con *L. mexicana* y a lo largo de varios estudios demostramos que tanto los promastigotes como los amastigotes logran dicha inhibición. Además, observamos que durante la inhibición de la apoptosis se induce una activación prolongada de Akt, mientras que se inhibe la fosforilación de JNK y p38 resultado de la inducción de la apoptosis con camptotecina. Por otro lado, demostramos también que en las células dendríticas infectadas se incrementa la presencia proteínica de Bcl-xL. Lo que sugiere una modulación de las proteínas de la familia Bcl-2 a través de la modulación de distintas vías de transducción de señales para mantener un balance antiapoptótico en las células hospederas infectadas con *L. mexicana* (Gutiérrez-Kobeh et al., 2013; Rodríguez-González et al., 2018, 2016; Valdés-Reyes et al., 2009; Vázquez-López et al., 2015).

Además de la participación de las MAPK, Akt y proteínas antiapoptóticas, se ha demostrado la participación de otras moléculas en la inhibición de la apoptosis. Por ejemplo, en macrófagos infectados con promastigotes de *L. donovani* se observó la inhibición de la apoptosis inducida con H₂O₂, pero no el incremento de las especies reactivas del oxígeno. Además. Se inhibe la activación de las caspasas ejecutoras 3 y 7, que podría estar mediado

por las proteínas supresoras de la señalización de las citocinas (SOCS), ya que en los macrófagos infectados se incrementa la expresión de estas. Adicionalmente, al silenciar los genes de las SOCS se incrementa la apoptosis en las células infectadas (Srivastav et al., 2014).

En un trabajo diferente se observó que en los macrófagos infectados con promastigotes de *L. donovani* se inhibe la apoptosis inducida con actinomicina D, al mismo tiempo que aumentan tanto los niveles de expresión como la presencia proteínica de Mcl-1. De modo que al silenciar el gen de Mcl-1 en los macrófagos infectados se logra la inducción de la apoptosis con la actinomicina D, lo mismo ocurre al silenciar el gen del factor de transcripción CREB. Esto sugiere que el factor de transcripción CREB está asociado con el incremento de Mcl-1 en las células infectadas (Giri et al., 2016).

En macrófagos infectados con promastigotes de *L. donovani* se inhibe la apoptosis inducida con H₂O₂, sin embargo, al inhibir específicamente a Akt o al mutar el gen de Akt con una construcción dominante negativa se revierte la inhibición de la apoptosis, al mismo tiempo que se incrementa la producción de la IL-12, disminuye la de la IL-10, y disminuye también la sobrevivencia del parásito. Adicionalmente, se observó que la participación de Akt es muy importante, ya que se encarga de regular de manera directa o indirecta la actividad de distintos factores de transcripción. Prueba de esto es que en los macrófagos infectados el factor de transcripción FOXO-1 se encuentra principalmente en el citosol, gracias a que es fosforilado por Akt. Mientras que, la inhibición de la fosforilación de FOXO-1 mediante una mutación del gen hace que permanezca en el núcleo de la célula hospedera, lo que revierte la inhibición de la apoptosis, ya que FOXO-1 puede continuar activando la expresión de genes proapoptóticos. En contraste, la cinasa GSK3- β es inactivada en los macrófagos infectados, gracias a la fosforilación por Akt, lo que permite que se incremente la concentración del factor de transcripción β -catenina, lo que su vez permite que se transloque al núcleo de la célula hospedera y se inicie la transcripción de genes antiapoptóticos. Sin embargo, cuando en los macrófagos infectados se introduce GSK-3 β constitutivamente activo o se apaga el gen de la β -catenina se revierte la inhibición de la apoptosis y se restaura la producción de la interleucina 12. Estos resultados exponen la importancia de la activación de la vía de Akt para que el parásito no solo inhiba la apoptosis, sino también la producción de citocinas que favorecen el control de enfermedad (Gupta et al., 2016).

Tanto en macrófagos de ratón, como en monocitos humanos de la línea celular THP-1, infectados con promastigotes de *L. donovani* se incrementa la expresión de Bcl-2, mientras que al usar inhibidores específicos de Bcl-2 se incrementa la producción de óxido nítrico (NO), con lo que se logra disminuir la carga parasitaria en las células hospederas. Esto se corroboró en pacientes con leishmaniasis visceral, ya que en estos pacientes se encontró un incremento en la expresión de Bcl-2 junto con niveles muy bajos de NO. Sin embargo, al silenciar la expresión del gen de TLR-2 o al usar inhibidores específicos de la vía de señalización de ERK se revierte el aumento en la presencia proteínica de Bcl-2 (Pandey et al., 2016).

En macrófagos de ratón infectados con *L. donovani* se inhibe la presencia proteínica del receptor de muerte programada 1 (PD-1) junto con la apoptosis inducida con H₂O₂. Además, en los macrófagos infectados se revierte la desactivación de Akt inducida por la activación de PD-1. En los macrófagos infectados y tratados con el inductor de la apoptosis se previene la asociación de la proteína fosfatasa específica de tirosina expresada de forma ubicua que contiene SH2 (SHP2) con PD-1, lo que previene que Akt sea desactivada (Roy et al., 2017). Lo que sugiere que tanto la modulación de la apoptosis por la vía intrínseca como la extrínseca podrían estar reguladas por la vía de transducción de señales de Akt en las células infectadas con *Leishmania*.

En los macrófagos infectados con promastigotes de *L. donovani* se induce la respuesta al estrés del mal plegado (UPR) en el retículo endoplásmico, lo que lleva a la activación de la cinasa tipo PKR del retículo endoplásmico (PERK), la que su vez activa a Akt, para finalmente inhibir la apoptosis inducida con distintos fármacos. Mientras que, al usar inhibidores específicos de PERK se previene la fosforilación de Akt junto con la fosforilación de algunos de los sustratos de Akt tales como Bad y GSK, lo cual está asociado a la prevención de la liberación del citocromo C y la activación de la caspasa 3 (Abhishek et al., 2018). Esto sugiere que, aunque *Leishmania* pudiera activar a Akt a través de la vía canónica, lo podría hacer también a través de la activación de la UPR, nuevamente señalando a la vía de Akt como un punto central durante la infección de las células hospederas.

En síntesis, *Leishmania* inhibe la apoptosis de las células hospederas sin importar el fondo genético de las mismas y sin importar el origen del estímulo apoptótico, aunque hace falta

demostrar que también puede inhibir la apoptosis inducida por la vía extrínseca. Sin embargo, como ya vimos, hay evidencia de que puede reducir la presencia proteínica de receptores de muerte como por ejemplo PD-1. Aunque se ha visto que *Leishmania* puede inhibir la apoptosis en células del sistema inmune tales como los macrófagos, neutrófilos y las células dendríticas, hacen falta estudios que demuestren que también puede inhibir la apoptosis en otros tipos celulares. La inhibición de la apoptosis en las células hospederas infectadas se ha demostrado a través de diferentes parámetros tanto morfológicos como bioquímicos. Entre los morfológicos podemos citar la condensación de la cromatina, la translocación de la fosfatidilserina, mientras que entre los parámetros bioquímicos podemos mencionar la activación de las caspasas ejecutoras, el incremento en la actividad enzimática de las mismas, la liberación del citocromo C, la MOMP, la fragmentación del DNA, etc. Durante la inhibición de la apoptosis se regulan también distintas vías de transducción de señales como lo son la desactivación de la vía de JNK y la de p38, mientras que se activan vías como las de ERK y Akt. Además, se modula la activación de proteínas antiapoptóticas como Bcl-2 y se desactivan proteínas proapoptóticas como Bid y Bad. Por último, se induce la expresión de genes antiapoptóticos como los de Bcl-2, Bcl-xL y Mcl-1, junto con el incremento en la presencia proteínica de estas moléculas (Figura 6).

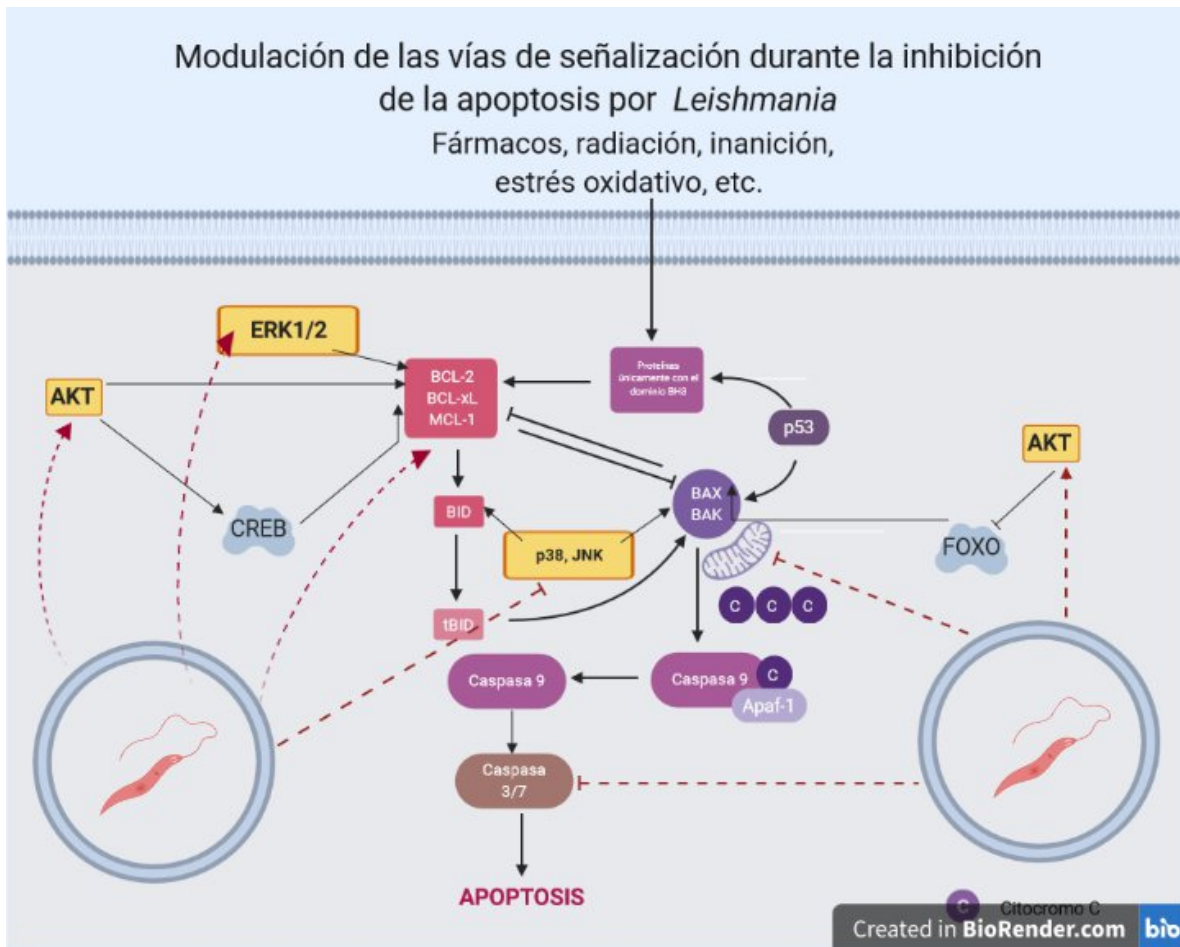


Figura 6. Vías de señalización y moléculas participantes en la inhibición de la apoptosis de la célula hospedera por *Leishmania*. *Leishmania* puede inhibir la apoptosis de la célula hospedera iniciada por distintos estímulos tales como la falta de nutrientes, el estrés oxidativo, fármacos. Del mismo modo, modula distintos niveles de la regulación de la apoptosis como la expresión y presencia de proteínas antiapoptóticas como por ejemplo Bcl-2, la liberación del citocromo C, la MOMP, la activación de las caspasas ejecutoras, como la 3, la regulación de factores transcripción como CREB y FOXO, la activación de Akt y de ERK o la desactivación de JNK y p38. Creado con BioRender.com

2. Planteamiento del problema

Específicamente de las células dendríticas humanas infectadas con *Leishmania mexicana* sólo sabemos que tanto los amastigotes como los promastigotes logran inhibir la apoptosis inducida con camptotecina y esto se demostró a través de distintos parámetros apoptóticos tales como la translocación de la fosfatidilserina, cambios morfológicos ultraestructurales, fragmentación del DNA y presencia y actividad enzimática de la caspasa 3. Además, en las DC infectadas se observó que se induce la desactivación de las vías de señalización de JNK y p38, mientras que se mantiene activa la vía de Akt durante la inducción de la apoptosis con la camptotecina. Por último, se demostró que se induce un incremento en la presencia proteínica de Bcl-xL (Gutiérrez-Kobeh et al., 2013; Rodríguez-González et al., 2018, 2016; Valdés-Reyes et al., 2009; Vázquez-López et al., 2015). Actualmente desconocemos si la activación de la vía de transducción de señales de Akt es necesaria para la inhibición de la apoptosis en las células infectadas con *Leishmania*, más específicamente de las células dendríticas infectadas con promastigotes de *Leishmania mexicana* y tampoco sabemos si es necesaria para el incremento en la presencia de las proteínas antiapoptóticas de la familia Bcl-2.

3. Objetivos

3.1 Objetivo general

Determinar si la activación de la vía de transducción de señales de Akt modula a las proteínas antiapoptóticas de la familia Bcl-2 durante la inhibición de la apoptosis en las células dendríticas infectadas con promastigotes de *Leishmania mexicana*.

3.2 Objetivos específicos

1. Determinar el efecto de un inhibidor específico de Akt en la sobrevivencia del parásito *L. mexicana* después de ser fagocitado por las células dendríticas.
2. Analizar algunos parámetros apoptóticos tales como la permeabilización de la membrana externa de la mitocondria o la presencia de la caspasa 3 posteriormente a la utilización de un inhibidor específico de Akt en las células dendríticas infectadas.
3. Determinar la presencia proteínica de Bcl-2 y MCL-1 en las células dendríticas infectadas con los promastigotes de *L. mexicana* y tratadas con la CPT, con o sin el inhibidor de Akt.

4. Hipótesis

La infección de las células dendríticas con promastigotes de *Leishmania mexicana* modula la presencia proteínica de Bcl-2 y MCL-1 a través de la activación de la cinasa AKT para finalmente inhibir la apoptosis inducida con un fármaco.

5. Metodología

5.1 Cultivo de células dendríticas derivadas de monocitos de sangre periférica humana (moDC).

Las células dendríticas se diferenciaron a partir de monocitos humanos, los cuales se obtuvieron de concentrados leucocitarios de donadores sanos. Los concentrados leucocitarios se obtuvieron del Banco de Sangre del Instituto Nacional de Cardiología "Ignacio Chávez". Las células mononucleares de sangre periférica humana se purificaron a partir del concentrado de leucocitos utilizando un gradiente de densidad por centrifugación con Histopaque®-1077 (Sigma-Aldrich; Merck KGaA, Darmstadt, Alemania), según las especificaciones del fabricante. Una vez purificadas las PBMC se marcaron con un anticuerpo monoclonal anti-CD14, el cual está acoplado a microperlas magnéticas (Miltenyi Biotec, BergischGladbach, Alemania). Siguiendo las especificaciones del fabricante y con la ayuda de un campo magnético se seleccionaron únicamente las células que unieron el anticuerpo, de esta manera se obtuvo la población de monocitos CD14⁺. Los monocitos se resuspendieron a una densidad de 1.0×10^6 en un mililitro de medio de cultivo RPMI suplementado con suero fetal bovino inactivado por calor (SFB) al 10% (Biowest, Riverside, MO, EUA), 50 μ M de 2-mercaptoetanol (Sigma-Aldrich; Merck KGaA), 100 U/ml de penicilina, 100 μ g/ml de estreptomina (Gibco; Thermo Fisher Scientific, Inc. Waltham, MA, USA), ajustado a pH 7.2 (R-10). Finalmente, los monocitos CD14⁺ se sembraron en placas de 24 pozos tratadas para cultivo celular (Corning, Corning, NY, USA) y se dejaron toda la noche a 37 °C con 5% de CO₂ en atmosfera húmeda. Al día siguiente se cambió el 50% de medio R-10 por medio de cultivo para la diferenciación a moDC, el cual consta de medio R-10 y las citocinas necesarias para inducir la diferenciación a células dendríticas (moDC), 1000 U/ml de IL-4 y 500 U/ml de GM-CSF (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ USA), ajustado a pH 7.2. En los días dos, cuatro y seis se cambió el 50% de medio por medio de cultivo fresco para la diferenciación de células dendríticas. Las moDC se cultivaron en los días 6-7 para caracterizarlas y usarlas en los diferentes ensayos (Romani et al., 1994; Sallusto and Lanzavecchia, 1994).

5.2 Caracterización de las moDC

Las moDC cosechadas en los días 6-7 de cultivo se lavaron con amortiguador salino de fosfatos modificado por Dulbecco (D-PBS) (Biowest) y se resuspendieron 1.0×10^6

monocitos/ml en D-PBS suplementado con 5% de suero de caballo y 5 mM de EDTA. Posteriormente se tiñeron siguiendo las especificaciones del fabricante con los siguientes anticuerpos acoplados a distintos fluorocromos: anti-DC-SIGN (CD-209) APC, anti-CD11c PEcy5, anti-CD14 PE, anti-HLA-DR FITC, anti-CD86 FITC y anti-CD3 FITC (BD Biosciences) y por último se lavaron con D-PBS. Finalmente, los monocitos se examinaron en un citómetro de flujo FACSCalibur (BD Biosciences), mientras que los datos se analizaron con el software FlowJo™ v10.0.7 (BD Biosciences). Cuando la lectura no se realizó el mismo día en que se tiñeron las moDC, las mismas se fijaron con 4% de paraformaldehído durante 15 min a temperatura ambiente, se lavaron con D-PBS y por último se almacenaron a 4 °C protegidas de la luz.

5.3 Cultivo de los promastigotes de *Leishmania mexicana*

En el presente estudio se utilizó la cepa LAC (MHOM/MX/2011/LAC) de *L. mexicana*, la cual se aisló de un paciente con leishmaniasis cutánea localizada (Rivera-Fernández et al., 2019). El cultivo celular de esta cepa se realizó principalmente con el estadio de amastigote. Los amastigotes se cultivaron a una densidad de 1×10^5 amastigotes/ml de medio Grace (Gibco; Thermo Fisher Scientific) suplementado con 20% de SFB (Biowest), 100 U/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomycin (Gibco; Thermo Fisher Scientific), ajustado a pH 5.4, a temperatura constante de 33 °C en frascos tratados para cultivo celular de 25 cm². El subcultivo se realizó en el séptimo día a una densidad de 1×10^5 amastigotes/ml de medio Grace ya suplementado (Bates et al., 1992). Para mantener la virulencia de la cepa LAC de *L. mexicana* se utilizaron ratones de la cepa Balb/c, la cual es susceptible a la infección por *Leishmania*. Los amastigotes del séptimo día de cultivo se lavaron con D-PBS y se inocularon 1×10^7 parásitos en el cojinete plantar de los ratones. Una vez que en el cojinete plantar del ratón se observó lesión se procedió a sacrificar al ratón y amputar la pata lesionada. Con la ayuda del émbolo de una jeringa de 10ml y una malla de nylon con poro de 100 µm (BD Biosciences) y D-PBS se maceró la extremidad lesionada. El macerado que se obtuvo se centrifugó durante 5 min a $100 \times g$ a 20 °C. El sobrenadante se recuperó y se centrifugó a $2000 \times g$ durante 10 min a 20 °C; la pastilla se lavó tres veces con D-PBS y los amastigotes aislados se sembraron a una densidad de 1×10^5 parásitos/ml de medio Grace previamente suplementado a pH 5.4 (Bates et al., 1992).

Durante el presente trabajo, las moDC se infectaron con promastigotes metacíclicos y se utilizaron para los distintos ensayos. A continuación, se describe brevemente la metodología para la obtención de los promastigotes metacíclicos. A partir del cultivo axénico de amastigotes se realizó un subcultivo a una densidad de 1×10^5 parásitos/ml en Medio 199 (Sigma-Aldrich; Merck KGaA) suplementado con 10% de SFB (Biowest), 100 U/ml de penicilina, 100 μ g/ml de estreptomina, 2 mM de L-glutamina (Gibco; Thermo Fisher Scientific), ajustado a pH 7.2 en frascos tratados para cultivo celular de 25 cm² a una temperatura constante de 26 °C. En el cuarto día de cultivo sólo se observaron promastigotes, y éstos se utilizaron para ser subcultivados a una densidad de 1×10^5 parásitos/ml en medio Grace suplementado con 10% de SFB (Biowest), 100 U/ml de penicilina, 100 mg/ml de estreptomina (Gibco; Thermo Fisher Scientific), ajustado a pH 5.4 en frascos tratados para cultivo celular de 25cm² a una temperatura constante de 26 °C durante 4-5 días, de esta manera se logró el enriquecimiento del cultivo con promastigotes metacíclicos, los cuales se caracterizaron morfológicamente y por la habilidad de infectar a las células (Bates and Tetley, 1993).

5.4 Infección y estímulo de las moDC

Todas las moDC utilizadas en el presente trabajo se trataron como se describe a continuación. Las moDC cosechadas se sembraron en placas tratadas para cultivo celular de 24 pozos (Corning, Corning, NY, USA) y se infectaron con promastigotes metacíclicos de *L. mexicana* en relación 10:1 (promastigotes/moDC), los cuales se cosecharon en el día 4-5 de cultivo. Para favorecer la fagocitosis de los parásitos por las moDC se co-incubaron durante dos horas a 26°C. Posteriormente, las moDC infectadas se incubaron con la camptotecina (CPT) (Sigma-Aldrich; Merck KGaA) a una concentración de 10 μ M, la cual induce la vía mitocondrial de la apoptosis, simultáneamente se incubaron con el inhibidor VIII específico de AKT (Sigma-Aldrich; Merck KGaA) a una concentración de 10 μ M. Los fármacos se incubaron con las moDC tanto separados como juntos. El tiempo de incubación con los fármacos fue de 12 horas a 37 °C en atmósfera húmeda con el 5% de CO₂. Transcurrido el tiempo de incubación se utilizaron las células para cada uno de los ensayos según se describe a continuación.

5.5 Determinación de la sobrevivencia de *L. mexicana*

Transcurridas 12 horas a partir de que las moDC se infectaron con los promastigotes metacíclicos de *L. mexicana* y se trataron con la CPT y/o con el inhibidor específico de Akt se procedió a determinar la sobrevivencia de los parásitos. Las moDC infectadas y estimuladas se lavaron con medio de cultivo R-10 a 4 °C durante 10 min a 400 × g, a continuación, se incubaron con SDS al 0.01% durante 10 min a 37 °C con 5% de CO₂, posteriormente se agregó Medio 199 suplementado y se centrifugó durante 10 min a 3000 × g a temperatura ambiente. Los amastigotes que se lograron liberar de las moDC se incubaron en medio 199 suplementado durante cuatro días a una temperatura constante de 26 °C. Con ayuda de un hemocitómetro, en el cuarto día de cultivo se estimó el total de la población de promastigotes que se transformaron a partir de amastigotes viables y los valores obtenidos se graficaron para analizar la sobrevivencia de los parásitos.

5.6 Evaluación de la MOMP en las moDC

Después de que las moDC se infectaron y se trataron con la CPT y/o con el inhibidor de Akt se procedió a evaluar la MOMP. Para evaluar la MOMP se utilizó el fluorocromo yoduro de 3,3'-dihexyloxacarboyanino (DiOC6), el cual es un cianino catiónico lipofílico que permea fácilmente hacia la matriz mitocondrial, donde queda secuestrado gracias a la carga negativa de la matriz mitocondrial. Sin embargo, cuando se da la MOMP se disipa el potencial eléctrico y por lo tanto se libera el fluorocromo. De este modo el DiOC6 tiñe intensamente a las células vivas, mientras que las células apoptóticas pierden gradualmente la coloración (Chang et al., 2013; Zamzami et al., 2000). Las células se tiñeron con 100 µl de DiOC6 a una concentración de 100 µM durante 10 min a 37 °C, a continuación, las células se lavaron con D-PBS y se analizaron con un citómetro de flujo FACSCalibur (BD Biosciences). Los datos que obtenidos se analizaron con el software FlowJo™ v10.0.7 (BD Biosciences).

5.7 Evaluación de la presencia proteínica de la caspasa 3, Bcl-2, Mcl-1 y Bcl-xL

Las moDC infectadas y estimuladas se lavaron tres veces con D-PBS durante 10 min a 400 × g a 4 °C. A continuación, se incubaron con 40 µl del amortiguador de lisis (25 mM de Tris-HCL, pH 7.6, 150 mM de NaCl, 1% de NP-40, 1% de desoxicolato de sodio y 0.1% de SDS),

suplementado con una mezcla de inhibidores de proteasas libre de EDTA (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany) durante 15 min. Después, las muestras se centrifugaron durante 10 min a $14,000 \times g$ a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, finalmente se colectó únicamente el sobrenadante (extracto total) y se almacenó a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$. La concentración de proteínas se determinó utilizando el kit de determinación de proteína por ácido bicinónico (Novagen; Merck KGaA). El perfil de proteínas se resolvió por medio de un SDS-PAGE preparado al 12%, en el que por cada condición se cargaron $40\text{ }\mu\text{g}$ de proteínas, aplicando una tensión eléctrica de 120 V durante 90 min. Posteriormente, el perfil de proteínas resuelto en el gel de acrilamida se electrotransfirió a una membrana de Immobilon-P (Millipore; Merck, KGaA) con la ayuda de una cámara de electrotransferencia semiseca (Bio-Rad Laboratories, Hércules, CA, EUA) aplicando una tensión eléctrica de 20 V durante 45 min. Una vez que se llevó a cabo la electrotransferencia, las membranas se incubaron con leche descremada (Bio-Rad Laboratories) al 5% disuelta en TBST (10 mM de Tris-HCl, pH 7.4, 150 mM de NaCl, 0.05% de Tween 20) durante 30 min, en seguida, las membranas se lavaron tres veces cada 5 min con TBST. Terminados los lavados, las membranas se incubaron toda la noche a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ con los siguientes anticuerpos primarios diluidos en 5% de leche descremada/TBST. Para identificar la caspasa 3 se utilizó un anticuerpo monoclonal hecho en conejo que reconoce tanto el zimógeno de 32 kDa, como el fragmento activo de 17 kDa (Chemicon; Merck KGaA). Para la identificación del zimógeno el anticuerpo se usó en dilución 1:3000, mientras que para el fragmento activo se usó en dilución 1:500. Para identificar las proteínas antiapoptóticas Bcl-2, Mcl-1 y Bcl-xL y la actina se usaron anticuerpos monoclonales hechos en ratón en una dilución 1:1000 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, EUA). Todos los anticuerpos primarios se diluyeron en 5% de leche descremada/TBST. Al día siguiente las membranas se lavaron tres veces cada 10 min con TBST. A continuación, se incubaron con los anticuerpos secundarios diluidos 1:5000 en TBST con leche descremada al 5% durante 1h a temperatura ambiente. Al anticuerpo primario, hecho en conejo, se unió un anticuerpo secundario que reconoce específicamente las IgG de conejo, mientras que a los anticuerpos primarios hechos en ratón se unió un anticuerpo secundario que reconoce específicamente las IgG de ratón (Cell Signaling Technology, Danvers, MA, EUA). Por último, las membranas se lavaron tres veces cada 5 min con TBST. Como todos los anticuerpos secundarios estaban acoplados a una peroxidasa de rábano (HRP) se usó un sustrato quimioluminiscente (Millipore; Merck, KGaA). La señal de quimioluminiscencia se evaluó y fotodocumentó con la ayuda de un ChemiDoc MP (Bio-Rad Laboratories) y el análisis de densitometría se realizó con el

software Image Lab 6.1 (Bio-Rad Laboratories).

5.8 Análisis estadístico

Los datos obtenidos se graficaron usando los promedios \pm el error estándar. Para evaluar las diferencias estadísticas se utilizó la prueba de ANOVA de una vía junto con la prueba de Tukey para la comparación multipareada, todo esto con la ayuda del software GraphPad Prism 6.01 (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, USA). Un valor de $p < 0.05$ se consideró significativo.

6. Resultados

6.1 Caracterización de las moDC

Las moDC se obtuvieron a partir de monocitos humanos CD14⁺ cultivados en medio para diferenciarlos enriquecido con las citocinas GM-CSF e IL-4 durante 5-6 días. Para evaluar la eficiencia del sistema de obtención de las moDC se analizaron por citometría de flujo algunos marcadores de la superficie celular.

El marcador de superficie celular CD209/DC-SIGN es un receptor de lectina de unión a manosas tipo C que participa en el reconocimiento de antígenos y la adhesión celular. En un principio se describió como un marcador exclusivo de las DC, sin embargo, hoy se sabe que otros tipos celulares pueden expresar este marcador, por ejemplo, los macrófagos. Durante el cultivo de las moDC se sabe que el marcador CD209/DC-SIGN comienza a aumentar gradualmente durante el tiempo de cultivo, por lo que resulta ser un excelente marcador de la eficiencia del sistema de cultivo y de la pureza de las moDC obtenidas (Geijtenbeek et al., 2000; Geurtsen et al., 2010). Las DC convencionales o mieloides expresan altos niveles del marcador de superficie celular CD11c a diferencia de las DC plasmacitoides que no lo expresan. CD11c es una integrina, conocida también como integrina αX , que forma heterodímeros con la proteína Itgb2 para formar el receptor 4 del complemento (CR4) (Collin and Bigley, 2018; Myones et al., 1988). En el cultivo de las moDC se ha demostrado también que las moDC inmaduras expresan altos niveles del complejo mayor de histocompatibilidad II (HLA-DR) y niveles intermedios de la molécula coestimuladora CD86, la cual es necesaria para la activación de los linfocitos T vírgenes. Además, se ha descrito que el marcador de superficie CD14 disminuye paulatinamente durante el tiempo de cultivo de las moDC observándose muy bajos niveles de expresión. CD14 es una proteína que junto con el TLR4 forman el receptor para el LPS (Romani et al., 1994; Sallusto and Lanzavecchia, 1994).

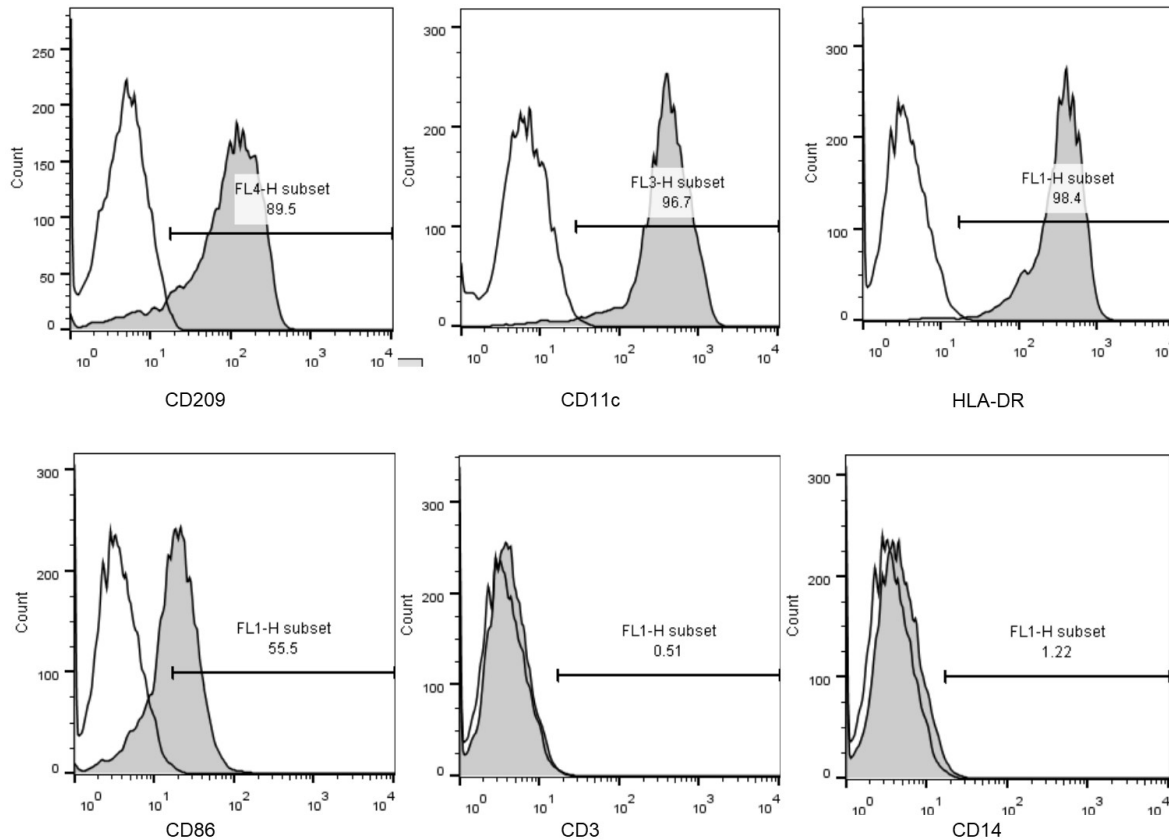


Figura 7. Caracterización de las moDC. Las moDC se obtuvieron a partir de monocitos CD14⁺ de sangre periférica humana, los cuales se diferenciaron en medio de cultivo enriquecido con las citocinas GM-CSF e IL-4. Después de 5 a 6 días de cultivo se cosecharon las moDC obtenidas y se caracterizaron por citometría de flujo con la ayuda de marcadores moleculares de superficie. Gracias a los marcadores CD209 y CD11c podemos decir que las moDC cosechadas tienen un alto nivel de pureza, mayor al 89%, mientras que con los marcadores HLA-DR y CD86 podemos decir que las moDC cosechadas se encuentran en estado inmaduro. Por último, gracias al marcador CD3 descartamos la contaminación por linfocitos y con el marcador CD14 la contaminación por monocitos.

Nuestros resultados muestran que el 89.5% de la población de las células cosechadas expresan el marcador CD209/DC-SIGN, el 96.7% expresan el marcador CD11c, el 98.4% son positivas para el marcador HLA-DR y el 55.5% son positivas para el marcador CD86. Además, que la contaminación por linfocitos CD3⁺ es muy baja junto con la de los monocitos CD14⁺. Los resultados muestran que el sistema utilizado para la diferenciación de las moDC es altamente eficiente, ya que el 89.5% de la población de las células expresa el marcador CD209/DC-SIGN, el cual es específico de las moDC. Al mismo tiempo, las moDC son principalmente de origen mieloide en tanto que el 96.7% de la población expresa el marcador CD11c. Las moDC obtenidas por este método se encuentran en estado inmaduro dado que expresan altos niveles del complejo mayor de histocompatibilidad II HLA-DR, al mismo tiempo que expresan bajos niveles de la molécula coestimuladora CD86.

Por otro lado, el sistema de cultivo de las moDC permite obtener muy bajos niveles de contaminación de linfocitos, ya que apenas el 0.5% de la población expresa el marcador CD3. Mientras que la contaminación por monocitos que no se diferenciaron, también, es muy baja, de apenas el 1.2% (Figura 7). Estos resultados, en conjunto, nos permiten concluir que las células cosechadas y utilizadas en cada uno de los ensayos de este trabajo son moDC inmaduras con un alto nivel de pureza y muy bajos niveles de contaminación. Estos datos nos permiten concluir que las moDC utilizadas en este estudio tienen un alto nivel de pureza y que son inmaduras.

6.2 *L. mexicana* permanece viable después de ser fagocitada por las moDC y expuesta al inhibidor de Akt y a la CPT

Para asegurarnos que los parásitos de *L. mexicana* permanecen viables después de ser fagocitados por las moDC y estar expuestos tanto a la camptotecina, como al inhibidor de Akt se realizaron ensayos de viabilidad. De manera breve, los promastigotes fagocitados por las moDC, y que se lograron transformar en amastigotes, se liberaron de las moDC formando poros en la membrana celular con ayuda del SDS. Los amastigotes liberados se incubaron en medio 199 con 10% de SFB durante cuatro días a 24° C. Únicamente los parásitos viables se transformaron en promastigotes por lo que se estimó el número total de estos. Nuestros resultados muestran que los amastigotes obtenidos de las vacuolas parasitóforas de las moDC tratadas con el inhibidor de Akt permanecen viables en comparación con los obtenidos de las moDC sin tratamiento. Por otro lado, en los amastigotes obtenidos, tanto de las moDC tratadas con la CPT como de las tratadas con la CPT más el inhibidor de Akt, disminuye significativamente la viabilidad comparada con los amastigotes obtenidos de las moDC tratadas únicamente con el inhibidor de Akt (Figura 8).

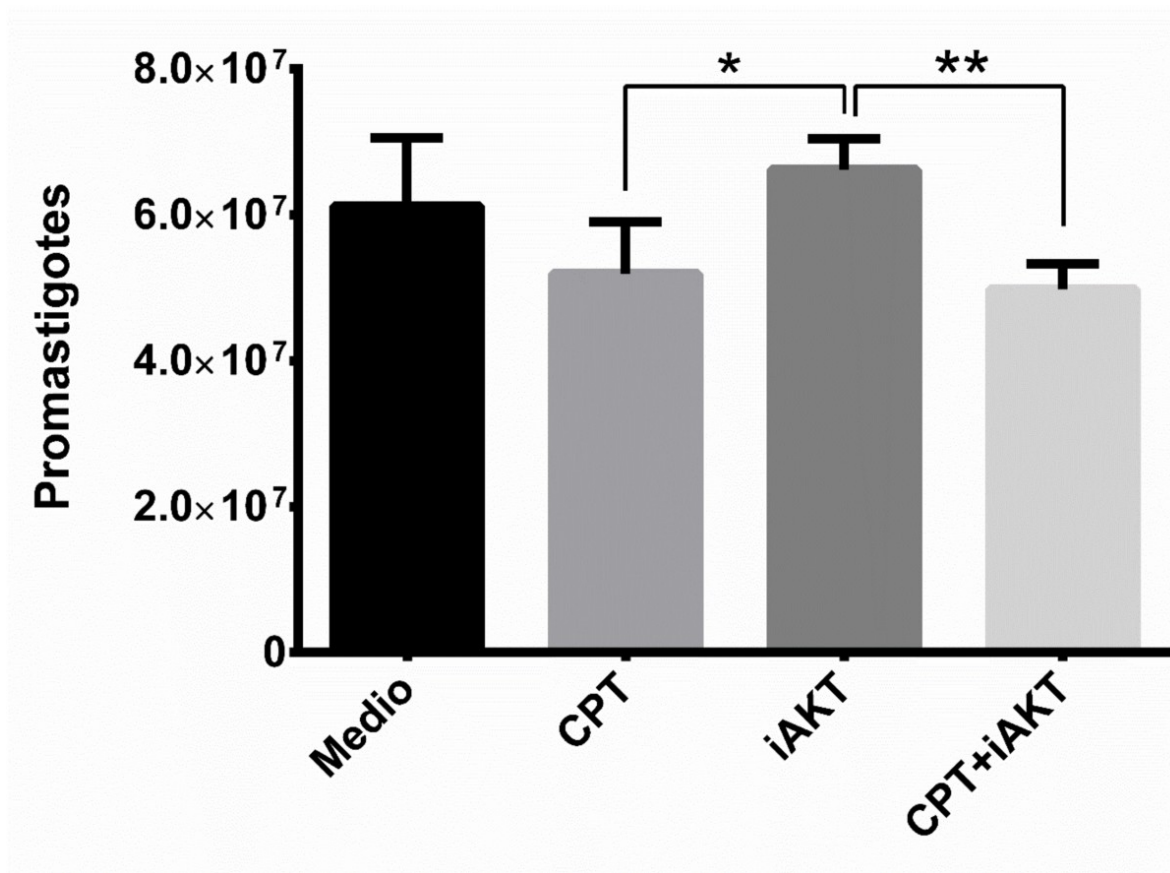


Figura 8. Viabilidad de los amastigotes de *L. mexicana* liberados de las moDC posteriormente del tratamiento con los distintos fármacos. Las moDC se infectaron con promastigotes metacíclicos, los cuales se transformaron en amastigotes dentro de la vacuola parasitófora, además, las moDC infectadas se incubaron con la CPT, el iAKT o con ambos. Los amastigotes se liberaron de las moDC con ayuda del SDS y se incubaron en Medio 199 suplementado con SFB. Únicamente los amastigotes viables se diferenciaron a promastigotes por lo que de esta manera se logró determinar el número de promastigotes viables después de cuatro días de cultivo. Gráfica del promedio del total de promastigotes de cinco experimentos independientes. Los asteriscos señalan las diferencias significativas (n= 5).

6.3 El inhibidor de Akt previene la inhibición de la MOMP inducido por *L. mexicana* en las moDC

Durante la apoptosis la MOMP es un punto de no retorno, debido a que se desencadenan procesos que son letales para la célula que llevan a la activación de las caspasas ejecutoras y el desmantelamiento de la célula. Por lo que la determinación de la MOMP resulta ser un excelente marcador apoptótico (Kalkavan and Green, 2018). Para determinar la MOMP en las moDC se tiñeron con el fluorocromo DiOC6, el cual tiñe intensamente a las células viables mientras que en las células apoptóticas se libera el fluorocromo en tanto que se disipa el potencial de la membrana interna mitocondrial (Zamzami et al., 2000). Nuestros resultados muestran que la CPT incrementa significativamente la MOMP en las moDC,

mientras que al coincubar con el inhibidor de Akt actúa en sinergia para incrementar el porcentaje de células en las que se ha dado la MOMP. Además, en las moDC infectadas se inhibe el incremento de la MOMP inducido por la CPT, lo cual se previene con la inhibición de Akt. Aunque, y de manera muy interesante, el porcentaje de las moDC infectadas y tratadas con ambos fármacos en las que se da la MOMP es significativamente menor que en las moDC únicamente tratadas con los fármacos (Figura 9), lo que sugiere que *L. mexicana* estaría utilizando otras vías de transducción de señales, además de la de Akt.

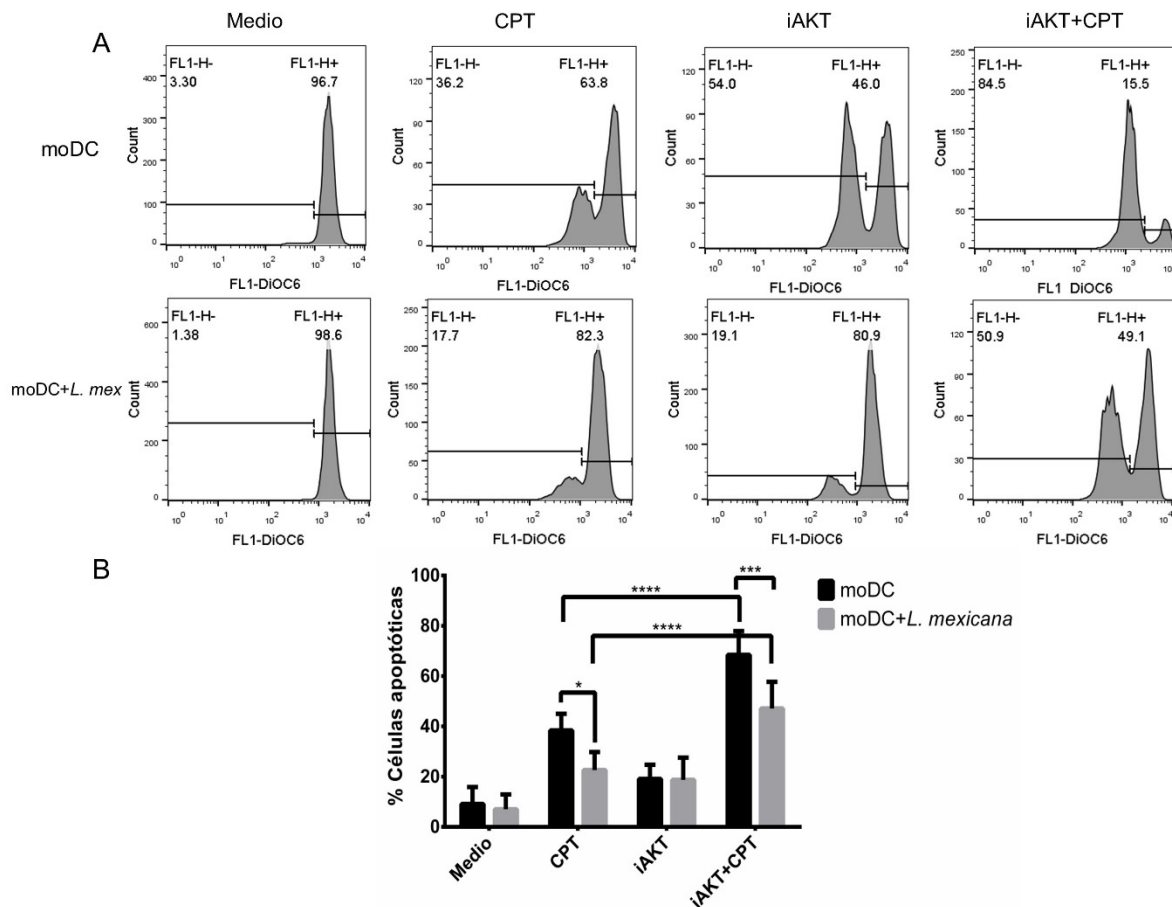


Figura 9. Evaluación del porcentaje de células apoptóticas utilizando el marcador DiOC6. Las moDC se infectaron y trataron con la CPT, el iAkt o con ambos, posteriormente se tiñeron con el fluorocromo DiOC6 para determinar la MOMP. Se utilizaron como controles las moDC sin ningún estímulo, y las moDC sin infectar y tratadas con cada uno de los fármacos o con ambos. **A**. Histogramas donde se grafica de la intensidad de fluorescencia de las moDC teñidas con el fluorocromo DiOC6. En las moDC tratadas con los fármacos se observan dos poblaciones, una con menor intensidad de fluorescencia, que corresponde a las moDC

apoptóticas, y otra con mayor intensidad de fluorescencia, que corresponde a las moDC viables. **B.** Gráfica con los promedios de los porcentajes de moDC apoptóticas. Los asteriscos señalan las diferencias significativas (* $p < 0.05$, *** $p < 0.0001$, **** $p < 0.00001$, $n = 6$).

6.4 El inhibidor de Akt previene la inhibición de la activación de la caspasa 3 en la moDC infectadas

Además de la MOMP, otro parámetro apoptótico que decidimos evaluar fue la activación de la caspasa 3. Las moDC infectadas y tratadas con el inhibidor de Akt y/o con la CPT se lisaron y se analizaron por la técnica de Western blot. Para el análisis de los datos se usó como control de carga la actina. Tal y como reportamos previamente, la infección de las moDC con los parásitos de *L. mexicana* disminuye significativamente la activación de la caspasa 3 inducida por la CPT (Gutiérrez-Kobeh et al., 2013; Rodríguez-González et al., 2018; Valdés-Reyes et al., 2009). Para saber si la vía de Akt participa en la disminución de la activación de la caspasa 3 utilizamos un inhibidor específico para esta cinasa. Nuestros resultados muestran que al inhibir a Akt se previene la disminución de la activación de la caspasa 3 en las moDC infectadas inducida por la CPT (Figura 10).

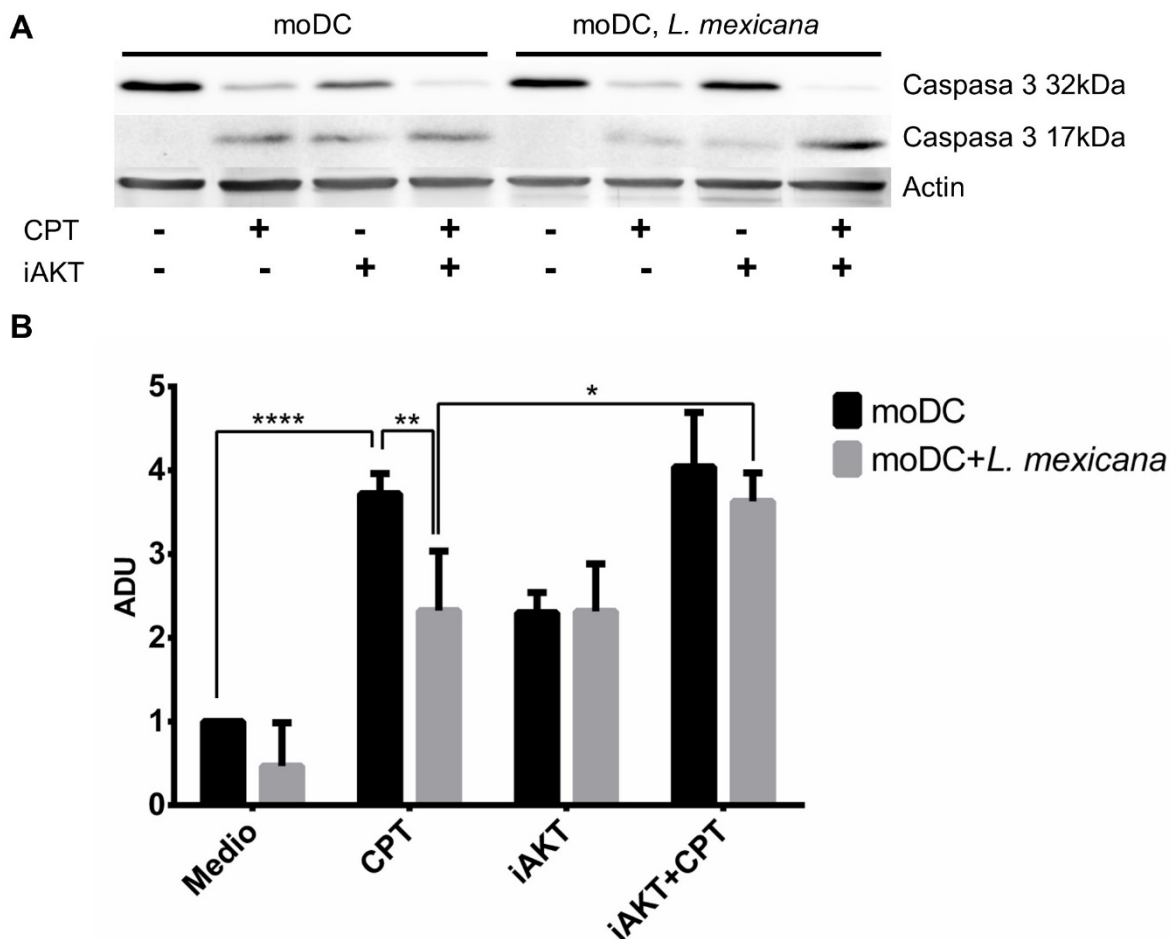


Figura 10. Modulación de la activación de la caspasa 3 en las moDC tratadas con el iAKT y la CPT, infectadas y no infectadas. Las moDC se cosecharon y se infectaron con promastigotes metacíclicos de *L. mexicana* y se trataron con cada uno de los fármacos o con ambos. Se utilizaron como controles las moDC sin ningún tratamiento y las moDC tratadas con cada uno de los fármacos o con ambos. Posteriormente las células se lisaron y los extractos totales se analizaron por la técnica de Western blot. **A.** Imagen representativa de un Western blot en donde se observa el zimógeno de la caspasa 3, la fracción activa de la caspasa 3 y la actina como control de carga. Estos resultados muestran que el zimógeno de la caspasa 3 (32 kDa) disminuye ante la exposición a la CPT y el iAKT, mientras aumenta la presencia de la caspasa 3 activa (17 kDa) en las moDC no infectadas. Por el contrario, en las moDC infectadas disminuye la activación de la caspasa 3 en presencia de la CPT, mientras que el iAkt revierte la disminución de la activación de la caspasa 3 en las moDC infectadas y tratadas con la CPT. Para el análisis de densitometría se realizó un cociente de los valores obtenidos de las bandas de la caspasa 3 activa con los valores obtenidos de las bandas del control de carga. **B.** Gráfica con los promedios de los valores normalizados de la densitometría. Los asteriscos señalan las diferencias significativas (* $p < 0.05$, ** $p < 0.001$, **** $p < 0.00001$, $n = 4$).

6.5 La infección de las moDC induce un decremento en la presencia proteínica de Bcl-2

Las proteínas de la familia Bcl-2 son las principales moléculas reguladoras de la MOMP durante la apoptosis que se caracterizan por el dominio de homología Bcl-2 (BH) y que se pueden dividir en antiapoptóticas, proapoptóticas efectoras y proapoptóticas que tienen

únicamente el dominio BH3. La proteína Bcl-2 es una proteína antiapoptótica que se encarga de inhibir la MOMP a través de la inactivación de las proteínas proapoptóticas (Luo et al., 2020). Se ha demostrado tanto en neutrófilos humanos, como en macrófagos murinos y humanos, que la infección con *Leishmania* induce el incremento de Bcl-2, lo cual está asociado con la inhibición de la apoptosis en las células infectadas (Cianciulli et al., 2018; Pandey et al., 2016; Sarkar et al., 2013). Por lo que, nosotros decidimos analizar si la infección de las moDC con promastigotes metacíclicos de *L. mexicana* incrementa la presencia de Bcl-2. Las moDC infectadas y tratadas se lisaron, mientras que el extracto proteínico se analizó por Western blot. Nuestros resultados muestran que la infección de las moDC con los promastigotes metacíclicos de *L. mexicana* induce el decremento de Bcl-2, aún en la presencia de la CPT, del inhibidor de Akt o de ambos (Figura 11). Estos datos junto con los de la literatura citada sugieren que esta disminución depende tanto de *L. mexicana* como del tipo celular infectado. Aunque hacen falta más estudios para demostrar esta hipótesis.

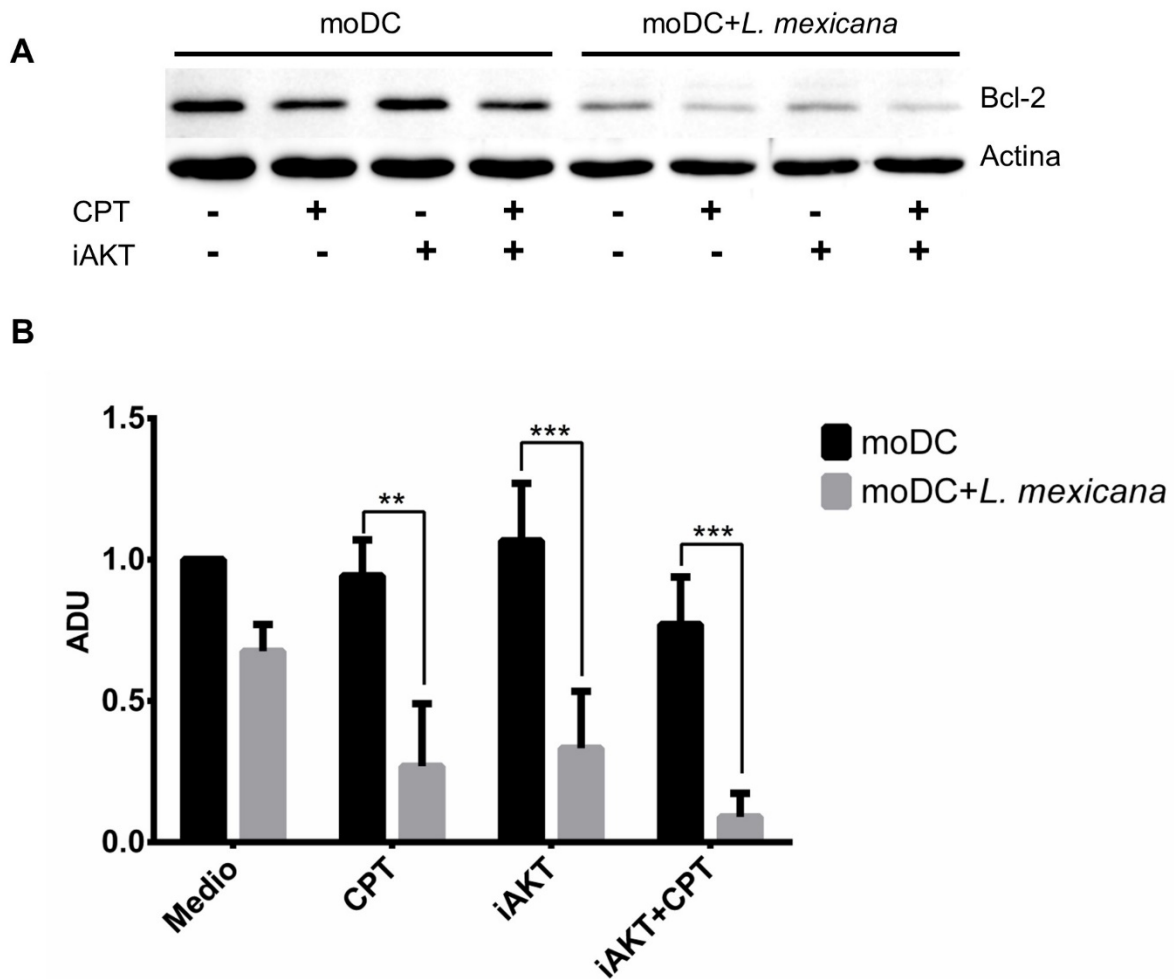


Figura 11. Modulación de Bcl-2 en las moDC tratadas con la CPT y el iAKT, infectadas y no infectadas. Las moDC cosechadas se infectaron con promastigotes metacíclicos de *L. mexicana* y se trataron con cada uno de los fármacos o con ambos. Se utilizaron como controles las moDC sin ningún tratamiento y las moDC tratadas con cada uno de los fármacos o con ambos. Posteriormente se lisaron y el extracto total se analizó por la técnica de Western blot. **A.** Imagen representativa de un Western blot donde se observa la presencia proteínica de Bcl-2 y de actina como control de carga. La infección de las moDC induce un decremento en la presencia proteínica de Bcl-2 aún en presencia de los fármacos. El análisis de densitometría se realizó a través de un cociente de los valores de la banda de Bcl-2 y los valores de la banda del control de carga. **B.** Gráfica de los promedios de los valores normalizados de densitometría de Bcl-2 bajo las diferentes condiciones. Los asteriscos señalan las diferencias significativas (** $p < 0.001$ *** $p < 0.0001$, $n = 4$).

6.6 La infección de las moDC induce un cambio de isoforma de Mcl-1

Mcl-1 es una proteína antiapoptótica de la familia Bcl-2 que, de la misma manera que Bcl-2, se encarga de regular la MOMP a través de la inactivación de proteínas antiapoptóticas. Sin embargo, presenta diferencias sustanciales con respecto a otras proteínas antiapoptóticas de la familia Bcl-2 debido a que se conocen al menos tres isoformas que resultan del splicing alternativo. La isoforma más conocida es Mcl-1L, o simplemente Mcl-

1, es la más grande pues tiene un peso aproximado de 40 kDa, y de las tres isoformas, es la única con actividad antiapoptótica, posee los cuatro dominios BH, uno transmembranal, el dominio de señalización mitocondrial (MTS) y una secuencia PEST, la cual es característica de proteínas de vida media corta. La segunda isoforma, por tamaño, es Mcl-1S pues tiene un peso estimado de 32 kDa, se forma por la pérdida del exón 2, lo que a nivel proteínico se traduce en la pérdida de los dominios BH1, BH2 y el dominio transmembranal, por lo que Mcl-1S tiene actividad proapoptótica y se encuentra principalmente en el citosol. La tercera isoforma conocida es Mcl-1ES, la cual es la proteína más pequeña de las tres pues contiene apenas 197 residuos de aminoácidos, se forma por la pérdida, en parte, del exón 1, lo que tienen como resultado la pérdida del dominio PEST y del dominio BH4, aunque conserva los dominios BH1-BH3 y el dominio transmembranal, sin embargo, bajo condiciones fisiológicas, no se ha observado ninguna función biológica (Senichkin et al., 2019). En macrófagos murinos infectados con promastigotes de *L. donovani* se observó un incremento en la expresión y la presencia proteínica de Mcl-1 (Giri et al., 2016). Con base en lo anterior, decidimos analizar si en las moDC infectadas con promastigotes metacíclicos de *L. mexicana* se incrementa la presencia proteínica de Mcl-1 en el contexto de la inhibición de AKT. Nuestros resultados muestran que la infección de las moDC induce un cambio de isoforma de Mcl-1 a Mcl-1S. Además, la CPT induce una disminución dramática tanto de Mcl-1 como de Mcl-1S en las moDC no infectadas e infectadas, respectivamente (Figura 12).

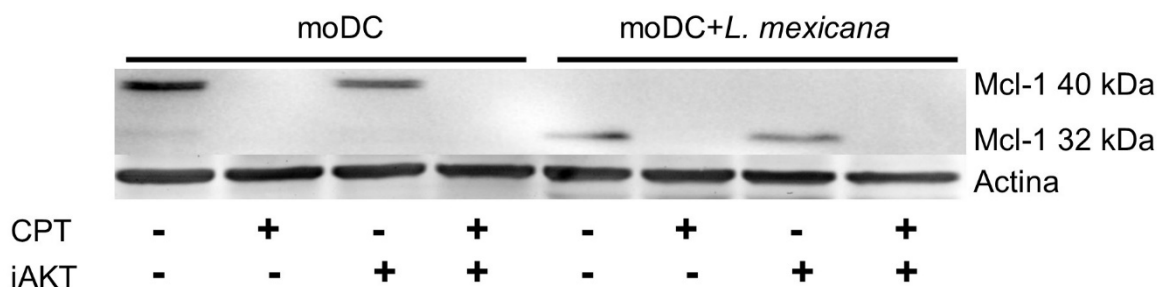


Figura 12. Modulación de la presencia proteínica de Mcl-1 en las moDC infectadas y no infectadas con promastigotes de *L. mexicana*. Las moDC cosechadas se infectaron con promastigotes metacíclicos de *L. mexicana*, enseguida se trataron con cada uno de los fármacos o con ambos. Posteriormente las células se lisaron y el extracto total se analizó por la técnica de Western blot. Imagen representativa de un Western blot donde se observa la presencia proteínica de Mcl-1 y de actina como control de carga. La infección de las moDC induce un cambio de isoforma de Mcl-1 a Mcl-1S, mientras que la CPT disminuye dramáticamente la presencia tanto de Mcl-1 como de Mcl-1S en las moDC no infectadas e infectadas, respectivamente (n=4).

6.7 El inhibidor de Akt previene el incremento de Bcl-xL en las moDC infectadas

En estudios previos, nuestro grupo de trabajo demostró que la infección de las moDC con promastigotes metacíclicos de *L. mexicana* induce un incremento en la presencia proteínica de Bcl-xL (Rodríguez-González et al., 2018). Sin embargo, no analizamos la posibilidad de que este incremento estuviera relacionado con nuestros resultados previos sobre la activación de Akt en las moDC infectadas (Vázquez-López et al., 2015). Ya que nuestros resultados muestran que la infección de las moDC no induce un incremento en la presencia de las proteínas Bcl-2, ni Mcl-1, decidimos retomar el resultado previo sobre Bcl-xL y analizarlo en el contexto de la inhibición de la vía de transducción de señales de Akt. Los resultados del presente trabajo muestran que la infección de las moDC con promastigotes metacíclicos de *L. mexicana* induce un incremento en la presencia de la proteína antiapoptótica Bcl-xL, mientras que en las moDC sin infectar disminuye drásticamente en presencia de la CPT, como ya lo habíamos demostrado anteriormente. De manera muy interesante, al inhibir a Akt se previene el incremento de Bcl-xL inducido por la infección de las moDC con los promastigotes de *L. mexicana* (Figura 13). Este resultado sugiere que la inducción del incremento en la presencia proteínica de Bcl-xL está regulado por la activación de la vía de transducción de señales de Akt.

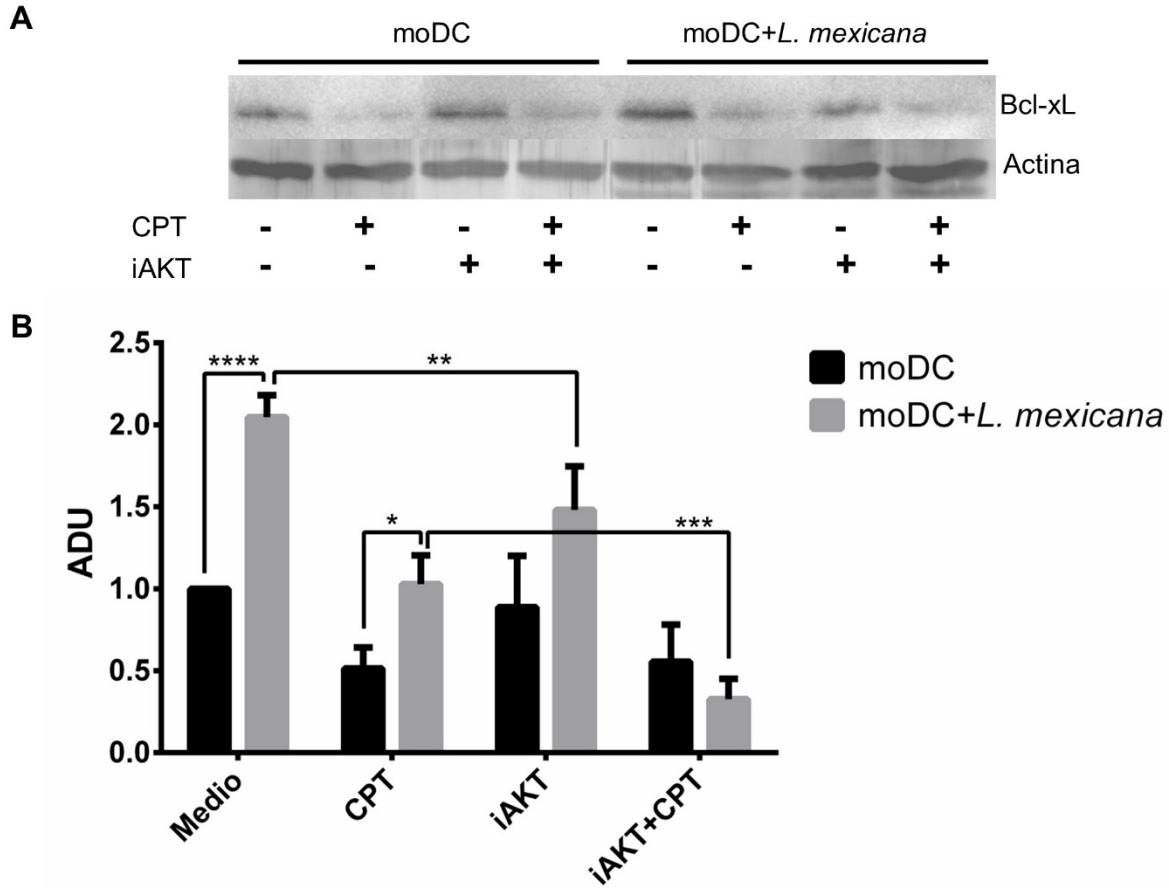


Figura 13. Modulación de la presencia proteínica de Bcl-xL en las moDC infectadas y no infectadas. Las moDC cosechadas se infectaron con promastigotes metacíclicos de *L. mexicana*, enseguida se trataron con cada uno de los fármacos o con ambos. Se utilizaron como controles las moDC sin ningún tratamiento, las moDC tratadas con cada uno de los fármacos o con ambos. Las células se lisaron y el extracto total se analizó por la técnica de Western blot. **A.** Imagen representativa de un Western blot donde se muestra la presencia proteínica de Bcl-xL y de actina como control de carga. Se observa que la infección de las moDC induce un incremento de Bcl-xL con respecto a las moDC no infectadas, mientras que el iAkt previene dicho aumento, tanto en las moDC infectadas como en las moDC infectadas y tratadas con la CPT. Para el análisis de densitometría se realizó un cociente de los valores obtenidos de las bandas de Bcl-xL y sus respectivos controles de carga, los valores obtenidos de las bandas de actina. **B.** Gráfica de los promedios de los valores normalizados de densitometría de Bcl-xL. Los asteriscos señalan las diferencias significativas (* $p < 0.05$, ** $p < 0.001$, *** $p < 0.0001$, **** $p < 0.00001$, $n = 4$).

7. Discusión

La infección de las células hospederas con distintas especies de *Leishmania* inhibe la apoptosis tanto natural, como inducida con distintos fármacos. En el presente trabajo analizamos si durante la inhibición de la apoptosis de las moDC infectadas con *L. mexicana* se incrementan las proteínas apoptóticas Bcl-2, Mcl-1 y Bcl-xL a través de la activación de la vía de transducción de señales de Akt.

La inhibición de la apoptosis de las células hospederas es un mecanismo ampliamente utilizado por diferentes organismos intracelulares. En el caso particular de los parásitos, se sabe que Otros parásitos intracelulares obligados, también, son capaces de inhibir la apoptosis de la célula hospedera tales como *Toxoplasma gondii*, *Plasmodium berghei* y *Trypanosoma cruzi*, por mencionar algunos, son capaces de inhibir la apoptosis de la célula hospedera (Leirião et al., 2005; Nakajima-Shimada et al., 2000; Nash et al., 1998). Además, tanto en las células infectadas con *To. gondii*, como en las infectadas con *T. cruzi*, se incrementa la presencia de proteínas antiapoptóticas de la familia Bcl-2 (Aoki et al., 2004; Hwang et al., 2010). Por otro lado, se demostró que distintas especies de *Leishmania* inducen un incremento de proteínas antiapoptóticas tales como Bcl-2, Bcl-xL, Bfl-1 y Mcl-1 en distintas células hospederas como macrófagos y neutrófilos (Cianciulli et al., 2018; Donovan et al., 2009; Giri et al., 2016; Pandey et al., 2016; Sarkar et al., 2013). En las células infectadas con *Leishmania*, se observó que se activa la vía de transducción de señales de Akt y que al inhibirla se previene la inhibición de la apoptosis (Abhishek et al., 2018; Gupta et al., 2016; Ruhland et al., 2007). Nuestro grupo de investigación, previamente, demostró que la infección de las moDC con *L. mexicana* induce un incremento de la proteína Bcl-xL (Rodríguez-González et al., 2018) y que, además, se activa la vía de Akt (Vázquez-López et al., 2015). Sin embargo, no se ha establecido una relación directa entre la activación de Akt y el incremento de las proteínas antiapoptóticas de la familia Bcl-2 durante la inhibición de la apoptosis en las moDC infectadas con *Leishmania*.

El modelo que utilizamos para el estudio fue el de inducción de la apoptosis con camptotecina. La camptotecina es un alcaloide derivado de la planta *Camptotheca acuminata*, la cual se ha probado como un potente inhibidor de la topoisomerasa I, por lo que desde 1970 se comenzó a utilizar como tratamiento en contra de varios tipos de tumores sólidos. La enzima topoisomerasa I se encarga de relajar el DNA superenrollado

durante los procesos de duplicación y transcripción del DNA. La CPT se une a la topoisomerasa I cuando ésta se encuentra unida al DNA formando un trímero altamente estable, lo que produce el rompimiento del DNA y finalmente la apoptosis de la célula (Raghavendra, 2020; Xu et al., 2012). La participación de la vía de Akt en la modulación de la apoptosis fue abordada mediante la utilización de un inhibidor de esta vía. Dada la utilización de estos fármacos lo primero que decidimos demostrar fue si los parásitos de *L. mexicana* permanecen viables después de ser fagocitados por las moDC y expuestos tanto al inhibidor de Akt, como a la CPT, ya que otros estudios demostraron que únicamente los parásitos de *Leishmania* viables son capaces de inhibir la apoptosis (Aga et al., 2002). Este fenómeno no es particular de *Leishmania*, ya que otros parásitos como por ejemplo *Toxoplasma gondii* necesitan estar viables para lograr inhibir la apoptosis (Goebel et al., 1999). Después de infectar a las moDC con promastigotes metacíclicos de *L. mexicana* e incubarlas con el inhibidor de Akt y con la CPT durante 12 horas, se liberaron los amastigotes localizados en las vacuolas parasitóforas y se sembraron en medio de cultivo suplementado. Después de cuatro días de cultivo, únicamente los amastigotes viables logran transformarse en promastigotes y duplicarse. Al estimar el número total de promastigotes por cada condición experimental, se encontró que no hay diferencias significativas entre el número de promastigotes obtenidos de las moDC sin tratamiento y las tratadas tanto con el inhibidor de Akt, como con la CPT o ambos. Estos resultados nos permiten concluir que los cambios observados en las moDC se deben a la infección con parásitos viables y no a un artefacto en el diseño experimental.

La vía de Akt es una vía que juega un papel muy importante en la supervivencia celular por lo que es un posible blanco utilizado por organismos intracelulares para inhibir la apoptosis de las células hospederas. En el caso de la infección de las moDC con *L. mexicana* no se había demostrado que la vía de Akt estuviera directamente relacionada con la inhibición de la apoptosis, por lo que decidimos inhibir específicamente a Akt y analizar tanto la MOMP como la activación de la caspasa 3. El análisis de la MOMP por citometría de flujo mostró que la CPT incrementa la MOMP en las moDC, mientras que la infección con los parásitos la inhibe. Sin embargo, al inhibir a Akt se previene la inhibición de la MOMP en las moDC infectadas. Además, el análisis por Western blot reveló que en las moDC infectadas y tratadas con la CPT se inhibe la activación de la caspasa 3, mientras que el inhibidor de Akt previene la inhibición de la caspasa 3 en las moDC infectadas y tratadas con la CPT. Con estos datos podemos decir que la activación de Akt es necesaria para que *L. mexicana*

logre inhibir la apoptosis de las moDC, lo cual es consistente con lo reportado previamente en macrófagos infectados con *L. donovani* (Gupta et al., 2016; Ruhland et al., 2007). Por otro lado, se sabe que en neutrófilos infectados con promastigotes de *L. major* participa la vía de señalización de ERK1/2, pues al inhibir farmacológicamente esta vía de señalización se revierte la inhibición de la apoptosis inducida en los neutrófilos infectados (Sarkar et al., 2013), por lo que resultaría interesante analizar si la vía de Akt actúa en conjunto con la de ERK1/2 para inhibir la apoptosis en las moDC infectadas con *L. mexicana*.

Además de la modulación de la vía de Akt como estrategia utilizada por diferentes microorganismos para inhibir la apoptosis, existen otras proteínas que son blancos utilizados por diferentes organismos para lograr este fin. Una de estas son las proteínas antiapoptóticas de la familia Bcl-2. Un ejemplo de modulación a través de estas proteínas es el caso del parásito intracelular *Toxoplasma gondii*. En las células infectadas con este parásito se mantiene un balance antiapoptótico, ya que se incrementa la presencia proteínica de Bcl-2 al tiempo que disminuye la de Bax y Bad (Carmen et al., 2006). Aunado a esto, en las células infectadas, también, se previene la fosforilación de Bad a través de PI3K (Quan et al., 2013), lo que hace suponer la importancia de la activación de la vía de PI3K/Akt para la inhibición de la apoptosis. Otro parásito que modula la apoptosis a través de estas proteínas es *Trypanosoma cruzi*. Se ha demostrado que en las células tratadas con una trasialidasa de *T. cruzi* se incrementa la presencia de Bcl-2, mientras que al inhibir específicamente a PI3K se previene dicho incremento (Chuenkova and Pereira, 2000). Otra proteína de *T. cruzi*, la cruzipaina, incrementa también la presencia de las proteínas Bcl-2 y Bcl-xL, mientras que al inhibir específicamente a MEK1 se previene el incremento de Bcl-2 y al inhibir específicamente PI3K se reduce la fosforilación de Akt al tiempo que se incrementa el número de células apoptóticas (Aoki et al., 2006, 2004). El hecho de que *To. gondii* y *T. cruzi* utilicen a las proteínas antiapoptóticas como blanco para la modulación de la apoptosis de las células hospederas nos hizo investigar el efecto de *L. mexicana* sobre estas proteínas. Decidimos analizar si la infección de las moDC con promastigotes metacíclicos de *L. mexicana* incrementa la presencia proteínica de Bcl-2 y Mcl-1 y si dicho aumento es modulado por la activación de Akt. Nuestros resultados muestran que, muy por el contrario de lo esperado, en las moDC no sólo no se incrementa la presencia de Bcl-2 o Mcl-1, sino que disminuye dramáticamente, sin importar si las moDC se trataron con la CPT, con el inhibidor de Akt o con ambos. Sin embargo, este fenómeno ha sido observado también en un modelo de astrocitos infectados con *To. gondii* en el que hay una disminución

de las proteínas antiapoptóticas Bcl-2 y survivina, mientras que hay un aumento en la expresión de genes proapoptóticos como Noxa. Interesantemente, se inhiben parámetros apoptóticos tales como la condensación de la cromatina y la actividad de las caspasas 3 y 7 (Contreras-Ochoa et al., 2013).

Se ha demostrado que un parámetro importante que influye en la inducción o en la inhibición de la apoptosis por un microorganismo es el tipo celular. En el caso de *Leishmania* se ha observado que la infección de diferentes tipos celulares con una misma especie de *Leishmania* puede conducir a la inhibición o la inducción de diferentes parámetros apoptóticos dependiendo del tipo celular (Zeng et al., 2016). Esto sugiere que, aunque estos parásitos son capaces de inhibir la apoptosis de la célula hospedera, regulan también negativamente proteínas antiapoptóticas ya que se observa un bloqueo de la apoptosis, sino un retraso hasta que se logran reproducir dentro de la célula hospedera. A favor de esta hipótesis están los datos reportados con neutrófilos humanos infectados con promastigotes de *L. major*, en donde observaron que la apoptosis de los neutrófilos se retrasa durante aproximadamente 24 horas (Aga et al., 2002). Además, a tiempos largos de infección, 48-72 horas, distintas especies, *L. aethiopica*, *L. tropica* y *L. major*, inducen la apoptosis de la célula hospedera (Getti et al., 2008). La inhibición de la apoptosis a tiempos cortos de infección resulta beneficiosa para el parásito pues logra reproducirse. Mientras que a tiempos largos lo que representa una ventaja para el organismo patogénico es la inducción de la apoptosis, pues de esta manera logra infectar a las células vecinas. Esto queda demostrado por el hecho de que los macrófagos que fagocitan neutrófilos apoptóticos infectados con *L. major* no reconocen al parásito y por lo tanto no se activan, lo que le confiere una gran ventaja al establecer la infección en el hospedero mamífero (van Zandbergen et al., 2004). Además, se demostró que tanto los promastigotes, como los amastigotes de *L. aethiopica* que son fagocitados por macrófagos se recubren con la membrana celular de los macrófagos apoptóticos, lo que nuevamente les daría posibilidad de invadir células vecinas sin activarlas (Ranatunga et al., 2020). Con base en lo anterior, la disminución de Bcl-2 y Mcl-1 en las moDC infectadas podría estar asociado a la inducción posterior de la apoptosis para la liberación de los parásitos e invasión silenciosa de las células vecinas, sin embargo, hacen falta más estudios para sustentar esta hipótesis.

En relación con otra proteína antiapoptótica, Bcl-xL, previamente demostramos que la infección de las moDC con promastigotes metacíclicos de *L. mexicana* induce un

incremento de esta proteína (Rodríguez-González et al., 2018). Debido a que los resultados que obtuvimos con Bcl-2 y Mcl-1 no mostraron un incremento de estas proteínas en las moDC infectadas con promastigotes de *L. mexicana*, decidimos analizar el efecto de la infección en el aumento de Bcl-xL durante la inhibición de Akt. Nuestros resultados corroboran lo reportado previamente, la infección de las moDC induce el aumento de la proteína antiapoptótica Bcl-xL. Interesantemente, la inhibición de Akt reduce el incremento de la proteína Bcl-xL. Esta proteína puede inhibir la apoptosis a través de la unión con proteínas proapoptóticas, manteniéndolas secuestradas en el citosol, o bien, a través de la unión de p53 (Borrás et al., 2020). Cuando se produce un daño al DNA, la proteína p53 induce la expresión de PUMA, que a su vez interfiere en el citosol con la unión de Bcl-xL y p53 (Follis et al., 2013). Una vez que p53 se encuentra libre en el citosol puede activar directamente a Bax (Chipuk et al., 2004) o a Bak (Leu et al., 2004) para que finalmente estos últimos inicien la MOMP. Debido a que el efecto inductor de la apoptosis de la camptotecina es través del daño al DNA, es posible que la infección de las moDC con los promastigotes metacíclicos de *L. mexicana* promueva el incremento de Bcl-xL para impedir la MOMP a través de la vía de p53/Bax/Bak, sin embargo, hacen falta más estudios para poder demostrar esta hipótesis.

8. Conclusión

En el presente trabajo demostramos que en las moDC infectadas con promastigotes metacíclicos de *Leishmania mexicana* es necesaria la presencia de la cinasa Akt activa para que se logre inhibir la apoptosis inducida con la camptotecina junto con el incremento de la proteína antiapoptótica Bcl-xL. Además, demostramos que la infección de las moDC induce el decremento de Bcl-2 y un cambio de isoforma de Mcl-1. Sin embargo, hacen falta más estudios para entender las causas de la disminución de la proteína antiapoptótica Bcl-2 y el cambio de isoforma de Mcl-1.

9. Referencias bibliográficas

<http://cenaprece.salud.gob.mx/programas/interior/vectores/descargas/pdf/ManualLeishmaniasis2015.pdf>

<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/leishmaniasis>

https://www.who.int/health-topics/leishmaniasis#tab=tab_1

- Abhishek, K., Das, S., Kumar, Ashish, Kumar, Ajay, Kumar, V., Saini, S., Mandal, A., Verma, S., Kumar, M., Das, P., 2018. Leishmania donovani induced Unfolded Protein Response delays host cell apoptosis in PERK dependent manner. *PLoS Neglected Tropical Diseases* 12, 1–22. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006646>
- Aga, E., Katschinski, D.M., van Zandbergen, G., Laufs, H., Hansen, B., Müller, K., Solbach, W., Laskay, T., 2002. Inhibition of the spontaneous apoptosis of neutrophil granulocytes by the intracellular parasite *Leishmania major*. *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 169, 898–905. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.169.2.898>
- Akarid, K., Arnoult, D., Micic-Polianski, J., Sif, J., Estaquier, J., Ameisen, J.C., 2004. *Leishmania major*-mediated prevention of programmed cell death induction in infected macrophages is associated with the repression of mitochondrial release of cytochrome c. *Journal of leukocyte biology* 76, 95–103. <https://doi.org/10.1189/jlb.1001877>
- Aoki, M. del P., Cano, R.C., Pellegrini, A.V., Tanos, T., Guiñazú, N.L., Coso, O.A., Gea, S., 2006. Different signaling pathways are involved in cardiomyocyte survival induced by a *Trypanosoma cruzi* glycoprotein. *Microbes and Infection* 8, 1723–1731. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2006.02.010>
- Aoki, M.P., Guiñazú, N.L., Pellegrini, A. V., Gotoh, T., Masih, D.T., Gea, S., 2004. Cruzipain, a major *Trypanosoma cruzi* antigen, promotes arginase-2 expression and survival of neonatal mouse cardiomyocytes. *American Journal of Physiology-Cell Physiology* 286, C206–C212. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00282.2003>
- Appelmelk, B.J., van Die, I., van Vliet, S.J., Vandenbroucke-Grauls, C.M.J.E., Geijtenbeek, T.B.H., van Kooyk, Y., 2003. Cutting Edge: Carbohydrate Profiling Identifies New Pathogens That Interact with Dendritic Cell-Specific ICAM-3-Grabbing Nonintegrin on Dendritic Cells. *The Journal of Immunology* 170, 1635–1639. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.170.4.1635>
- Argueta-Donohué, J., Wilkins-Rodríguez, A.A., Aguirre-García, M., Gutiérrez-Kobeh, L., 2016. Differential phagocytosis of *Leishmania mexicana* promastigotes and amastigotes by monocyte-derived dendritic cells. *Microbiology and Immunology* 60, 369–381. <https://doi.org/10.1111/1348-0421.12325>

- Bates, P.A., 2007. Transmission of *Leishmania* metacyclic promastigotes by phlebotomine sand flies. *International journal for parasitology* 37, 1097–106. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2007.04.003>
- Bates, P.A., Robertson, C.D., Tetley, L., Coombs, G.H., 1992. Axenic cultivation and characterization of *Leishmania mexicana* amastigote-like forms. *Parasitology* 105, 193–202. <https://doi.org/10.1017/S0031182000074102>
- Bates, P.A., Tetley, L., 1993. *Leishmania mexicana*: induction of metacyclogenesis by cultivation of promastigotes at acidic pH. *Experimental parasitology* 76, 412–23. <https://doi.org/10.1006/expr.1993.1050>
- Bennett, C.L., Misslitz, A., Colledge, L., Aebischer, T., Clare Blackburn, C., 2001. Silent infection of bone marrow-derived dendritic cells by *Leishmania mexicana* amastigotes. *European Journal of Immunology* 31, 876–883. [https://doi.org/10.1002/1521-4141\(200103\)31:3<876:AID-IMMU876>3.0.CO;2-I](https://doi.org/10.1002/1521-4141(200103)31:3<876:AID-IMMU876>3.0.CO;2-I)
- Bogdan, C., Rölinghoff, M., 1998. The immune response to *Leishmania*: mechanisms of parasite control and evasion. *International Journal for Parasitology* 28, 121–134. [https://doi.org/10.1016/S0020-7519\(97\)00169-0](https://doi.org/10.1016/S0020-7519(97)00169-0)
- Borrás, C., Mas-Bargues, C., Román-Domínguez, A., Sanz-Ros, J., Gimeno-Mallench, L., Inglés, M., Gambini, J., Viña, J., 2020. BCL-xL, a Mitochondrial Protein Involved in Successful Aging: From *C. elegans* to Human Centenarians. *International journal of molecular sciences* 21, 418. <https://doi.org/10.3390/ijms21020418>
- Burza, S., Croft, S.L., Boelaert, M., 2018. Leishmaniasis. *Lancet (London, England)* 392, 951–970. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(18\)31204-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(18)31204-2)
- Carmen, J.C., Hardi, L., Sinai, A.P., 2006. *Toxoplasma gondii* inhibits ultraviolet light-induced apoptosis through multiple interactions with the mitochondrion-dependent programmed cell death pathway. *Cellular Microbiology* 8, 301–315. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2005.00622.x>
- Chang, H.-Y., Huang, H.-C., Huang, T.-C., Yang, P.-C., Wang, Y.-C., Juan, H.-F., 2013. Flow Cytometric Detection of Mitochondrial Membrane Potential. *BIO-PROTOCOL* 3, e430. <https://doi.org/10.21769/BioProtoc.430>
- Chipuk, J.E., Kuwana, T., Bouchier-Hayes, L., Droin, N.M., Newmeyer, D.D., Schuler, M., Green, D.R., 2004. Direct activation of Bax by p53 mediates mitochondrial membrane permeabilization and apoptosis. *Science (New York, N.Y.)* 303, 1010–4. <https://doi.org/10.1126/science.1092734>

- Cho, S.-G., Choi, E.-J., 2002. Apoptotic signaling pathways: caspases and stress-activated protein kinases. *Journal of biochemistry and molecular biology* 35, 24–7. <https://doi.org/10.5483/bmbrep.2002.35.1.024>
- Chuenkova, M. V, Pereira, M.A., 2000. A Trypanosomal Protein Synergizes with the Cytokines Ciliary Neurotrophic Factor and Leukemia Inhibitory Factor to Prevent Apoptosis of Neuronal Cells. *Molecular Biology of the Cell* 11, 1487–1498. <https://doi.org/10.1091/mbc.11.4.1487>
- Cianciulli, A., Porro, C., Calvello, R., Trotta, T., Panaro, M.A., 2018. Resistance to apoptosis in *Leishmania infantum*-infected human macrophages: a critical role for anti-apoptotic Bcl-2 protein and cellular IAP1/2. *Clinical and Experimental Medicine* 18, 251–261. <https://doi.org/10.1007/s10238-017-0482-1>
- Collin, M., Bigley, V., 2018. Human dendritic cell subsets: an update. *Immunology* 154, 3–20. <https://doi.org/10.1111/imm.12888>
- Colmenares, M., Corbi, A.L., Turco, S.J., Rivas, L., 2004. The Dendritic Cell Receptor DC-SIGN Discriminates among Species and Life Cycle Forms of *Leishmania*. *The Journal of Immunology* 172, 1186–1190. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.172.2.1186>
- Colmenares, M., Puig-Kröger, A., Pello, O.M., Corbí, A.L., Rivas, L., 2002. Dendritic Cell (DC)-specific Intercellular Adhesion Molecule 3 (ICAM-3)-grabbing Nonintegrin (DC-SIGN, CD209), a C-type Surface Lectin in Human DCs, Is a Receptor for *Leishmania* Amastigotes. *Journal of Biological Chemistry* 277, 36766–36769. <https://doi.org/10.1074/jbc.M205270200>
- Contreras, I., Estrada, J.A., Guak, H., Martel, C., Borjian, A., Ralph, B., Shio, M.T., Fournier, S., Krawczyk, C.M., Olivier, M., 2014. Impact of *Leishmania mexicana* Infection on Dendritic Cell Signaling and Functions. *PLoS Neglected Tropical Diseases* 8, e3202. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003202>
- Contreras-Ochoa, C.O., Lagunas-Martínez, A., Belkind-Gerson, J., Díaz-Chávez, J., Correa, D., 2013. *Toxoplasma gondii* invasion and replication within neonate mouse astrocytes and changes in apoptosis related molecules. *Experimental Parasitology* 134, 256–265. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2013.03.010>
- Dai, H., Meng, X.W., Kaufmann, S.H., 2016. Mitochondrial apoptosis and BH3 mimetics. *F1000Research* 5, 2804. <https://doi.org/10.12688/f1000research.9629.1>
- Donovan, M.J., Maciuba, B.Z., Mahan, C.E., McDowell, M.A., 2009. *Leishmania* infection inhibits cycloheximide-induced macrophage apoptosis in a strain-dependent manner. *Experimental parasitology* 123, 58–64. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2009.05.012>
- Elmore, S., 2007. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicologic pathology* 35,

Follis, A.V., Chipuk, J.E., Fisher, J.C., Yun, M.-K., Grace, C.R., Nourse, A., Baran, K., Ou, L., Min, L., White, S.W., Green, D.R., Kriwacki, R.W., 2013. PUMA binding induces partial unfolding within BCL-xL to disrupt p53 binding and promote apoptosis. *Nature chemical biology* 9, 163–8. <https://doi.org/10.1038/nchembio.1166>

Galluzzi, L., Bravo-San Pedro, J.M., Vitale, I., Aaronson, S. a, Abrams, J.M., Adam, D., Alnemri, E.S., Altucci, L., Andrews, D., Annicchiarico-Petruzzelli, M., Baehrecke, E.H., Bazan, N.G., Bertrand, M.J., Bianchi, K., Blagosklonny, M. V, Blomgren, K., Borner, C., Bredesen, D.E., Brenner, C., Campanella, M., Candi, E., Cecconi, F., Chan, F.K., Chandel, N.S., Cheng, E.H., Chipuk, J.E., Cidlowski, J.A., Ciechanover, A., Dawson, T.M., Dawson, V.L., De Laurenzi, V., De Maria, R., Debatin, K.-M., Di Daniele, N., Dixit, V.M., Dynlacht, B.D., El-Deiry, W.S., Fimia, G.M., Flavell, R.A., Fulda, S., Garrido, C., Gougeon, M.-L., Green, D.R., Gronemeyer, H., Hajnoczky, G., Hardwick, J.M., Hengartner, M.O., Ichijo, H., Joseph, B., Jost, P.J., Kaufmann, T., Kepp, O., Klionsky, D.J., Knight, R.A., Kumar, S., Lemasters, J.J., Levine, B., Linkermann, A., Lipton, S.A., Lockshin, R.A., López-Otín, C., Lugli, E., Madeo, F., Malorni, W., Marine, J.-C., Martin, S.J., Martinou, J.-C., Medema, J.P., Meier, P., Melino, S., Mizushima, N., Moll, U., Muñoz-Pinedo, C., Nuñez, G., Oberst, A., Panaretakis, T., Penninger, J.M., Peter, M.E., Piacentini, M., Pinton, P., Prehn, J.H., Puthalakath, H., Rabinovich, G.A., Ravichandran, K.S., Rizzuto, R., Rodrigues, C.M., Rubinsztein, D.C., Rudel, T., Shi, Y., Simon, H.-U., Stockwell, B.R., Szabadkai, G., Tait, S.W., Tang, H.L., Tavernarakis, N., Tsujimoto, Y., Vanden Berghe, T., Vandenabeele, P., Villunger, A., Wagner, E.F., Walczak, H., White, E., Wood, W.G., Yuan, J., Zakeri, Z., Zhivotovsky, B., Melino, G., Kroemer, G., 2014. Essential versus accessory aspects of cell death: recommendations of the NCCD 2015. *Cell death and differentiation* 22, 1–16. <https://doi.org/10.1038/cdd.2014.137>

Galluzzi, L., Vitale, I., Abrams, J.M., Alnemri, E.S., Baehrecke, E.H., Blagosklonny, M. V, Dawson, T.M., Dawson, V.L., El-Deiry, W.S., Fulda, S., Gottlieb, E., Green, D.R., Hengartner, M.O., Kepp, O., Knight, R.A., Kumar, S., Lipton, S.A., Lu, X., Madeo, F., Malorni, W., Mehlen, P., Nuñez, G., Peter, M.E., Piacentini, M., Rubinsztein, D.C., Shi, Y., Simon, H.-U., Vandenabeele, P., White, E., Yuan, J., Zhivotovsky, B., Melino, G., Kroemer, G., 2012. Molecular definitions of cell death subroutines: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2012. *Cell death and differentiation* 19, 107–20. <https://doi.org/10.1038/cdd.2011.96>

Geijtenbeek, T.B.H., Torensma, R., van Vliet, S.J., van Duijnhoven, G.C.F., Adema, G.J., van Kooyk, Y., Figdor, C.G., 2000. Identification of DC-SIGN, a Novel Dendritic Cell-Specific ICAM-3 Receptor that Supports Primary Immune Responses. *Cell* 100, 575–585. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)80693-5](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80693-5)

Getti, G.T., Cheke, R.A., Humber, D.P., 2008. Induction of apoptosis in host cells: a survival mechanism for *Leishmania* parasites? *Parasitology* 135, 1391–1399. <https://doi.org/10.1017/S0031182008004915>

- Geurtsen, J., Driessen, N.N., Appelmelk, B.J., 2010. Mannose–fucose recognition by DC-SIGN, in: *Microbial Glycobiology*. Elsevier, pp. 673–695. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374546-0.00034-1>
- Giri, J., Srivastav, S., Basu, M., Palit, S., Gupta, P., Ukil, A., 2016. Leishmania donovani Exploits Myeloid Cell Leukemia 1 (MCL-1) Protein to Prevent Mitochondria-dependent Host Cell Apoptosis. *Journal of Biological Chemistry* 291, 3496–3507. <https://doi.org/10.1074/jbc.M115.672873>
- Goebel, S., Lüder, C.G.K., Gross, U., 1999. Invasion by Toxoplasma gondii protects human-derived HL-60 cells from actinomycin D-induced apoptosis. *Medical Microbiology and Immunology* 187, 221–226. <https://doi.org/10.1007/s004300050096>
- Green, D. R., & Llambi, F. (2015). Cell death signaling. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 7(12). <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a006080>
- Gupta, P., Srivastav, S., Saha, S., Das, P.K., Ukil, A., 2016. Leishmania donovani inhibits macrophage apoptosis and pro-inflammatory response through AKT-mediated regulation of β -catenin and FOXO-1. *Cell Death & Differentiation* 23, 1815–1826. <https://doi.org/10.1038/cdd.2016.101>
- Gutiérrez-Kobeh, L., de Oyarzabal, E., Argueta, J., Wilkins, A., Salaiza, N., Fernández, E., López, O., Aguirre, M., Becker, I., 2013. Inhibition of dendritic cell apoptosis by Leishmania mexicana amastigotes. *Parasitology research* 112, 1755–62. <https://doi.org/10.1007/s00436-013-3334-2>
- Hwang, I.-Y., Quan, J.H., Ahn, M.-H., Hassan Ahmed, H.A., Cha, G.-H., Shin, D.-W., Lee, Y.-H., 2010. Toxoplasma gondii infection inhibits the mitochondrial apoptosis through induction of Bcl-2 and HSP70. *Parasitology Research* 107, 1313–1321. <https://doi.org/10.1007/s00436-010-1999-3>
- Jin, Z., El-Deiry, W.S., 2005. Overview of cell death signaling pathways. *Cancer biology & therapy* 4, 139–63. <https://doi.org/10.4161/cbt.4.2.1508>
- Kale, J., Osterlund, E.J., Andrews, D.W., 2018. BCL-2 family proteins: changing partners in the dance towards death. *Cell death and differentiation* 25, 65–80. <https://doi.org/10.1038/cdd.2017.186>
- Kalkavan, H., Green, D.R., 2018. MOMP, cell suicide as a BCL-2 family business. *Cell death and differentiation* 25, 46–55. <https://doi.org/10.1038/cdd.2017.179>
- Kautz-Neu, K., Noordegraaf, M., Dinges, S., Bennett, C.L., John, D., Clausen, B.E., von Stebut, E., 2011. Langerhans cells are negative regulators of the anti- Leishmania response. *The*

- Kollek, M., Müller, A., Egle, A., Erlacher, M., 2016. Bcl-2 proteins in development, health, and disease of the hematopoietic system. *The FEBS Journal* 283, 2779–2810. <https://doi.org/10.1111/febs.13683>
- Leirião, P., Albuquerque, S.S., Corso, S., van Gemert, G.-J., Sauerwein, R.W., Rodriguez, A., Giordano, S., Mota, M.M., 2005. HGF/MET signalling protects Plasmodium-infected host cells from apoptosis. *Cellular Microbiology* 7, 603–609. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2004.00490.x>
- Leu, J.I.-J., Dumont, P., Hafey, M., Murphy, M.E., George, D.L., 2004. Mitochondrial p53 activates Bak and causes disruption of a Bak-Mcl1 complex. *Nature cell biology* 6, 443–50. <https://doi.org/10.1038/ncb1123>
- Lisi, S., Sisto, M., Acquafredda, A., Spinelli, R., Schiavone, M., Mitolo, V., Brandonisio, O., Panaro, M., 2005. Infection with *Leishmania infantum* Inhibits actinomycin D-induced apoptosis of human monocytic cell line U-937. *The Journal of eukaryotic microbiology* 52, 211–7. <https://doi.org/10.1111/j.1550-7408.2005.00026.x>
- Luo, X., O'Neill, K.L., Huang, K., 2020. The third model of Bax/Bak activation: a Bcl-2 family feud finally resolved? *F1000Research* 9, 935. <https://doi.org/10.12688/f1000research.25607.1>
- Manning, B.D., Toker, A., 2017. AKT/PKB Signaling: Navigating the Network. *Cell* 169, 381–405. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.04.001>
- Martínez-López, M., Iborra, S., Conde-Garrosa, R., Sancho, D., 2015. Batf3-dependent CD103 + dendritic cells are major producers of IL-12 that drive local Th1 immunity against *Leishmania* major infection in mice. *European Journal of Immunology* 45, 119–129. <https://doi.org/10.1002/eji.201444651>
- Maurício, I.L., 2018. *Leishmania* Taxonomy, in: *The Leishmaniases: Old Neglected Tropical Diseases*. Springer International Publishing, Cham, pp. 15–30. https://doi.org/10.1007/978-3-319-72386-0_2
- Melby, P.C., Travi, B.L., Yaneth Osorio, E., 2019. *Leishmania*, in: *Encyclopedia of Microbiology*. Elsevier, pp. 769–779. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801238-3.02473-9>
- Moore, K.J., Turco, S.J., Matlashewski, G., 1994. *Leishmania donovani* infection enhances macrophage viability in the absence of exogenous growth factor. *Journal of Leukocyte Biology* 55, 91–98. <https://doi.org/10.1002/jlb.55.1.91>

- Mosser, D.M., Edelson, P.J., 1985. The mouse macrophage receptor for C3bi (CR3) is a major mechanism in the phagocytosis of *Leishmania* promastigotes. *Journal of immunology* (Baltimore, Md.: 1950) 135, 2785–9.
- Myones, B.L., Dalzell, J.G., Hogg, N., Ross, G.D., 1988. Neutrophil and monocyte cell surface p150,95 has iC3b-receptor (CR4) activity resembling CR3. *Journal of Clinical Investigation* 82, 640–651. <https://doi.org/10.1172/JCI113643>
- Nakajima-Shimada, J., Zou, C., Takagi, M., Umeda, M., Nara, T., Aoki, T., 2000. Inhibition of Fas-mediated apoptosis by *Trypanosoma cruzi* infection. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* 1475, 175–183. [https://doi.org/10.1016/S0304-4165\(00\)00059-3](https://doi.org/10.1016/S0304-4165(00)00059-3)
- Nash, P.B., Purner, M.B., Leon, R.P., Clarke, P., Duke, R.C., Curiel, T.J., 1998. *Toxoplasma gondii*-infected cells are resistant to multiple inducers of apoptosis. *Journal of immunology* (Baltimore, Md.: 1950) 160, 1824–30.
- Pandey, R.K., Mehrotra, S., Sharma, S., Gudde, R.S., Sundar, S., Shaha, C., 2016. *Leishmania donovani*-Induced Increase in Macrophage Bcl-2 Favors Parasite Survival. *Frontiers in Immunology* 7. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2016.00456>
- Petritis, P.M., Manzoni-de-Almeida, D., Gimblet, C., Gonzalez Lombana, C., Scott, P., 2012. *Leishmania mexicana* induces limited recruitment and activation of monocytes and monocyte-derived dendritic cells early during infection. *PLoS neglected tropical diseases* 6, e1858. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0001858>
- Quan, J.H., Cha, G.H., Zhou, W., Chu, J.Q., Nishikawa, Y., Lee, Y.H., 2013. Involvement of PI 3 kinase/Akt-dependent Bad phosphorylation in *Toxoplasma gondii*-mediated inhibition of host cell apoptosis. *Experimental Parasitology* 133, 462–471. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2013.01.005>
- Raghavendra, P.B., 2020. Camptothecin and analogs: role in anticancer activities. *Camptothecin and Camptothecin Producing Plants* 103–140. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-820499-3.00003-3>
- Ranatunga, M., Rai, R., Richardson, S.C.W., Dyer, P., Harbige, L., Deacon, A., Pecorino, L., Getti, G.T.M., 2020. *Leishmania aethiopica* cell-to-cell spreading involves caspase-3, Akt, and NF- κ B but not PKC- δ activation and involves uptake of LAMP-1-positive bodies containing parasites. *The FEBS Journal* 287, 1777–1797. <https://doi.org/10.1111/febs.15166>
- Redza-Dutordoir, M., & Averill-Bates, D. A. (2016). Activation of apoptosis signalling pathways by reactive oxygen species. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 1863(12), 2977–2992. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2016.09.012>

- Rivera-Fernández, I., Argueta-Donohué, J., Wilkins-Rodríguez, A.A., Gutiérrez-Kobeh, L., 2019. Effect of Two Different Isolates of *Leishmania mexicana* in the Production of Cytokines and Phagocytosis by Murine Dendritic Cells. *Journal of Parasitology* 105, 359. <https://doi.org/10.1645/17-158>
- Rodríguez-González, J., Wilkins-Rodríguez, A., Argueta-Donohué, J., Aguirre-García, M., Gutiérrez-Kobeh, L., 2016. *Leishmania mexicana* promastigotes down regulate JNK and p-38 MAPK activation: Role in the inhibition of camptothecin-induced apoptosis of monocyte-derived dendritic cells. *Experimental Parasitology* 163, 57–67. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2015.12.005>
- Rodríguez-González, J., Wilkins-Rodríguez, A.A., Gutiérrez-Kobeh, L., 2018. Role of glutathione, ROS, and Bcl-xL in the inhibition of apoptosis of monocyte-derived dendritic cells by *Leishmania mexicana* promastigotes. *Parasitology Research* 117, 1225–1235. <https://doi.org/10.1007/s00436-018-5804-z>
- Romani, N., Gruner, S., Brang, D., Kämpgen, E., Lenz, A., Trockenbacher, B., Konwalinka, G., Fritsch, P.O., Steinman, R.M., Schuler, G., 1994. Proliferating dendritic cell progenitors in human blood. *Journal of Experimental Medicine* 180, 83–93. <https://doi.org/10.1084/jem.180.1.83>
- Rothe, M., Pan, M. G., Henzel, W. J., Ayres, T. M., & Goeddel, D. v. (1995). The TNFR2-TRAF signaling complex contains two novel proteins related to baculoviral inhibitor of apoptosis proteins. *Cell*, 83(7), 1243–1252. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(95\)90149-3](https://doi.org/10.1016/0092-8674(95)90149-3)
- Roy, S., Gupta, P., Palit, S., Basu, M., Ukil, A., Das, P.K., 2017. The role of PD-1 in regulation of macrophage apoptosis and its subversion by *Leishmania donovani*. *Clinical & Translational Immunology* 6, e137. <https://doi.org/10.1038/cti.2017.12>
- Ruhland, A., Leal, N., Kima, P.E., 2007. *Leishmania* promastigotes activate PI3K/Akt signalling to confer host cell resistance to apoptosis. *Cellular microbiology* 9, 84–96. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2006.00769.x>
- Sallusto, F., Lanzavecchia, A., 1994a. Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor plus interleukin 4 and downregulated by tumor necrosis factor alpha. *The Journal of experimental medicine* 179, 1109–18. <https://doi.org/10.1084/jem.179.4.1109>
- Sarkar, A., Aga, E., Bussmeyer, U., Bhattacharyya, A., Möller, S., Hellberg, L., Behnen, M., Solbach, W., Laskay, T., 2013. Infection of neutrophil granulocytes with *Leishmania major* activates ERK 1/2 and modulates multiple apoptotic pathways to inhibit apoptosis. *Medical microbiology and immunology* 202, 25–35. <https://doi.org/10.1007/s00430-012-0246-1>

- Schleicher, U., Liese, J., Knippertz, I., Kurzmann, C., Hesse, A., Heit, A., Fischer, J.A.A., Weiss, S., Kalinke, U., Kunz, S., Bogdan, C., 2007. NK cell activation in visceral leishmaniasis requires TLR9, myeloid DCs, and IL-12, but is independent of plasmacytoid DCs. *The Journal of Experimental Medicine* 204, 893–906. <https://doi.org/10.1084/jem.20061293>
- Schönlau, F., Scharffetter-Kochanek, K., Grabbe, S., Pietz, B., Sorg, C., Sunderkötter, C., 2000. In experimental leishmaniasis deficiency of CD18 results in parasite dissemination associated with altered macrophage functions and incomplete Th1 cell response. *European Journal of Immunology* 30, 2729–2740. [https://doi.org/10.1002/1521-4141\(200009\)30:9<2729::AID-IMMU2729>3.0.CO;2-3](https://doi.org/10.1002/1521-4141(200009)30:9<2729::AID-IMMU2729>3.0.CO;2-3)
- Senichkin, V. V., Streletskaia, A.Y., Zhivotovsky, B., Kopeina, G.S., 2019. Molecular Comprehension of Mcl-1: From Gene Structure to Cancer Therapy. *Trends in cell biology* 29, 549–562. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2019.03.004>
- Srivastav, S., Basu Ball, W., Gupta, P., Giri, J., Ukil, A., Das, P.K., 2014. Leishmania donovani prevents oxidative burst-mediated apoptosis of host macrophages through selective induction of suppressors of cytokine signaling (SOCS) proteins. *The Journal of biological chemistry* 289, 1092–105. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.496323>
- Steverding, D., 2017. The history of leishmaniasis. *Parasites & Vectors* 10, 82. <https://doi.org/10.1186/s13071-017-2028-5>
- Sunter, J., Gull, K., 2017. Shape, form, function and Leishmania pathogenicity: from textbook descriptions to biological understanding. *Open Biology* 7, 170165. <https://doi.org/10.1098/rsob.170165>
- Taylor, R.C., Cullen, S.P., Martin, S.J., 2008. Apoptosis: Controlled demolition at the cellular level. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 9, 231–241. <https://doi.org/10.1038/nrm2312>
- Valdés-Reyes, L., Argueta, J., Morán, J., Salaiza, N., Hernández, J., Berzunza, M., Aguirre-García, M., Becker, I., Gutiérrez-Kobeh, L., 2009. Leishmania mexicana: inhibition of camptothecin-induced apoptosis of monocyte-derived dendritic cells. *Experimental parasitology* 121, 199–207. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2008.10.020>
- van Zandbergen, G., Klinger, M., Mueller, A., Dannenberg, S., Gebert, A., Solbach, W., Laskay, T., 2004. Cutting edge: neutrophil granulocyte serves as a vector for Leishmania entry into macrophages. *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 173, 6521–5. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.173.11.6521>
- Varfolomeev, E., Goncharov, T., Fedorova, A. v, Dynek, J. N., Zobel, K., Deshayes, K., Fairbrother, W. J., & Vucic, D. (2008). c-IAP1 and c-IAP2 are critical mediators of tumor necrosis factor alpha (TNFalpha)-induced NF-kappaB activation. *The Journal of Biological*

Chemistry, 283(36), 24295–24299. <https://doi.org/10.1074/jbc.C800128200>

- Vázquez-López, R., Argueta-Donohué, J., Wilkins-Rodríguez, A., Escalona-Montaño, A., Aguirre-García, M., Gutiérrez-Kobeh, L., 2015. Leishmania mexicana amastigotes inhibit p38 and JNK and activate PI3K/AKT: role in the inhibition of apoptosis of dendritic cells. *Parasite immunology* 37, 579–89. <https://doi.org/10.1111/pim.12275>
- von Stebut, E., 2016. Parasites Dampen Dendritic Cell Activation to Ensure Their Survival. *Trends in Parasitology* xx, 1–2. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2016.12.001>
- von Stebut, E., Belkaid, Y., Jakob, T., Sacks, D.L., Udey, M.C., 1998. Uptake of Leishmania major Amastigotes Results in Skin derived Dendritic Cells: Implications for the Initiation of Anti-Leishmania Immunity. *The Journal of experimental medicine* 188, 1547–1552.
- Wilkins-Rodriguez, A.A., Escalona-Montano, A.R., Aguirre-Garcia, M., Becker, I., Gutiérrez-Kobeh, L., 2010. Regulation of the expression of nitric oxide synthase by Leishmania mexicana amastigotes in murine dendritic cells. *Experimental parasitology* 126, 426–434. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2010.07.014>
- Woelbing, F., Kostka, S.L., Moelle, K., Belkaid, Y., Sunderkoetter, C., Verbeek, S., Waisman, A., Nigg, A.P., Knop, J., Udey, M.C., von Stebut, E., 2006. Uptake of Leishmania major by dendritic cells is mediated by Fcγ receptors and facilitates acquisition of protective immunity. *The Journal of Experimental Medicine* 203, 177–188. <https://doi.org/10.1084/jem.20052288>
- Xu, B., Ding, J., Chen, K.X., Miao, Z.H., Huang, H., Liu, H., Luo, X.M., 2012. Advances in Cancer Chemotherapeutic Drug Research in China. *Recent Advances in Cancer Research and Therapy* 287–350. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-397833-2.00012-1>
- Zamzami, N., Métivier, D., Kroemer, G., 2000. Quantitation of Mitochondrial Transmembrane Potential in Cells and in Isolated Mitochondria, in: *Methods in Enzymology*. Academic Press, pp. 208–213. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(00\)22021-1](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(00)22021-1)
- Zeng, J., Chen, Q.-W., Yu, Z.-Y., Zhang, J.-R., Chen, D.-L., Song, C., Luo, J., Zhang, C., Wang, S.-L., Chen, J.-P., 2016. Regulation of intrinsic apoptosis in cycloheximide-treated macrophages by the Sichuan human strain of Chinese Leishmania isolates. *Acta Tropica* 153, 101–110. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2015.10.010>
- Zhang, X., Tang, N., Hadden, T.J., Rishi, A.K., 2011. Akt, FoxO and regulation of apoptosis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* 1813, 1978–1986. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2011.03.010>

Anexo: artículo requisito para la obtención del grado

Involvement of Akt and the antiapoptotic protein Bcl-xL in the inhibition of apoptosis of dendritic cells by *Leishmania mexicana*

Jorge Rodríguez-González^{1,2}  | Arturo A. Wilkins-Rodríguez¹ | Laila Gutiérrez-Kobeh¹ 

¹Unidad de Investigación UNAM-INC, División de Investigación, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico City, Mexico

²Posgrado en Ciencias Biológicas, Facultad de Medicina, Unidad de Posgrado, Ciudad Universitaria, Mexico City, Mexico

Correspondence

Laila Gutiérrez-Kobeh, Unidad Periférica de Investigación UNAM-INC, División de Investigación, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, Juan Badiano No. 1, Col. Sección XVI, Delegación Tlalpan, C.P. 14080 Mexico City, Mexico.
Email: lgutier@unam.mx

Funding information

Dirección General de Asuntos del Personal Académico, Universidad Nacional Autónoma de México, Grant/Award Number: IN218119

Abstract

The intracellular parasite *Leishmania mexicana* inhibits camptothecin (CPT)-induced apoptosis of monocyte-derived dendritic cells (moDC) through the down-regulation of p38 and JNK phosphorylation, while the kinase Akt is maintained active for 24 h. In addition, the infection of moDC with *L. mexicana* promastigotes increases the protein presence of the antiapoptotic protein Bcl-xL. In the present work, we aimed to investigate the role of Akt in the inhibition of apoptosis of moDC by *L. mexicana* and in the modulation of the expression of the antiapoptotic proteins Bcl-2, Mcl-1 and Bcl-xL. moDC were infected with *L. mexicana* metacyclic promastigotes and treated with CPT, an Akt inhibitor, or both and the mitochondrial outer membrane permeabilization (MOMP) and protein presence of active caspase 3, Bcl-2, Mcl-1 and Bcl-xL were evaluated. Our results show that the specific inhibition of Akt reverts the apoptosis protective effect exerted by *L. mexicana* on moDC reflected by a reduction in MOMP, caspase 3 activation, and upregulation of Bcl-xL. Interestingly, we also found that the infection of moDC with *L. mexicana* promastigotes induces a decrease in Bcl-2 along with an isoform change of Mcl-1, this independently to Akt activity. We demonstrated that Akt is deeply involved in the inhibition of apoptosis of moDC by *L. mexicana*.

KEYWORDS

Akt, apoptosis, Bcl-2, Bcl-xL, dendritic cells, *Leishmania mexicana*, Mcl-1

1 | INTRODUCTION

The term leishmaniasis comprises a group of diseases caused by trypanosomatids of the genus *Leishmania* which are transmitted through the bite of phlebotomine sandflies (*Lutzomyia* genus in America and *Phlebotomus* genus in Europe, Asia and Africa). It is estimated that leishmaniasis affects nearly 14 million people around the world with a calculated annual incidence of 2 million people.¹ In Mexico, the principal etiologic agent of leishmaniasis is *Leishmania mexicana* that causes two clinical forms: localized cutaneous leishmaniasis (LCL) and diffuse cutaneous leishmaniasis (DCL). Other *Leishmania* species, such as *L. infantum* and *L. braziliensis*, can cause visceral and

mucocutaneous leishmaniasis, respectively. *L. braziliensis* can also cause cutaneous leishmaniasis.²

Being an obligate intracellular parasite, *Leishmania* requires mechanisms to manipulate its host cells both to evade the immune response and to increase its survival inside them, and thus complete its life cycle. One of these mechanisms is the inhibition of apoptosis. Apoptosis is a type of cell death characterized by defined morphologic and physiologic changes with the participation of a wide variety of molecules and different activation and effector pathways. These pathways inevitably conduct apoptosis to a point of no return represented by the mitochondrial outer membrane permeabilization (MOMP), which is highly regulated by proteins with BH homology domains of

the Bcl-2 family (B2 cells lymphoma).³ This family is composed of three main groups: antiapoptotic proteins that possess the homology domains BH1, BH2, BH3 and BH4, such as Bcl-2, Bcl-xL, MCL-1; proapoptotic proteins that also have the homology domains BH1, BH2, BH3 and BH4, such as Bax and Bak, which are the proteins that initiate the MOMP; and lastly proapoptotic proteins that possess only the homology domain BH3, such as Bad, Bid, Bik, Bmf, PUMA, NOXA, Hrk, which are in charge of sensing apoptotic signals and regulate executioner proapoptotic and antiapoptotic proteins of the Bcl-2 family.⁴ Once MOMP is initiated, several factors such as Apaf, cytochrome c, and SMAC are released and lead to the activation of executioner caspases. Other factors such as endonuclease G, AIF and CAD can directly fragment DNA.⁵

It has been shown that *Leishmania* parasites manipulate several signalling pathways or proteins that regulate apoptosis in order to persist inside host cells. In studies carried out in murine macrophages and human neutrophils it has been observed that the infection with *L. major* or *L. donovani* promastigotes induces the overexpression of Bcl-xL, Bcl-2 and Bfl-1.^{6,7} In the same way, it has been demonstrated that the use of silencing RNA (siRNA) for Bcl-2 or Mcl-1 and for the transcription factor CREB diminishes the parasite load in murine macrophages along with parasite survival.^{8,9} In addition, it has been observed in patients with visceral leishmaniasis that Bcl-2 is overexpressed and the levels of nitric oxide diminished.⁹

A molecule that is deeply involved in cell survival and hence in apoptosis is Akt, which is a kinase that phosphorylates serine or threonine residues. In the canonical pathway Akt is activated through tyrosine kinase-coupled receptors (RTK) or G proteins coupled receptors that recruit and induce the activation of the kinase PI3K to form PI3P. This phospholipid recruits Akt through the plekstrin domain, which facilitates Akt phosphorylation by PDK1 and mTORC2 and in this way achieve the complete activation of Akt.¹⁰ This signalling pathway participates in diverse cellular processes such as differentiation, proliferation, metabolism and apoptosis regulation.¹¹ Regarding the role of Akt in the inhibition of apoptosis by *Leishmania*, it has been shown that the infection of host cells with the parasite activates Akt and its silencing or inhibition reverts the protective effect exerted by this parasite against apoptosis.^{12,13}

Leishmania parasites infect different types of cells, among which dendritic cells (DC) play a key role in shaping the immune response. Once DC internalize and process *Leishmania* antigens, they activate naïve T cells to initiate a Th1/Tc1 adaptive immune response, which is necessary for the control of the infection by the host.¹⁴ Due to this, it is of utmost importance to study the mechanisms through which *Leishmania* modulates DC apoptosis, which is an important defence mechanism. Previously, our group demonstrated that both *L. mexicana* promastigotes and amastigotes inhibit camptothecin (CPT)-induced apoptosis of monocyte-derived dendritic cells (moDC). We also showed that the parasite inhibits CPT-induced phosphorylation of JNK and p38, while Akt is maintained active for 24 h. In addition, the infection of moDC with *L. mexicana* promastigotes increases the protein presence of Bcl-xL.¹⁵⁻¹⁹

In the present work, we analysed if Akt participates in the inhibition of apoptosis and in the modulation of the expression of

antiapoptotic proteins of the Bcl-2 family in moDC infected with *L. mexicana*. Our results show that the specific inhibition of Akt prevents the inhibition of apoptosis and the increase of the antiapoptotic protein Bcl-xL in moDC infected with *L. mexicana* metacyclic promastigotes. Interestingly, we also found that the infection of moDC with *L. mexicana* promastigotes induces a decrease in Bcl-2 along with an isoform change of Mcl-1, this independently to Akt activity.

2 | MATERIALS AND METHODS

2.1 | moDC culture

moDC were differentiated from CD14⁺ monocytes as described previously.^{20,21} Peripheral blood monocytes were obtained from buffy coats from healthy donors kindly supplied by the blood bank of the National Institute of Cardiology 'Ignacio Chávez'. Informed consent from donors was obtained for the use of blood samples according to the declaration of Helsinki and the local scientific and ethics committees approved the protocol. Peripheral blood mononuclear cells were purified using Histopaque-1077 (Sigma-Aldrich; Merck KGaA) density gradient centrifugation at 400 × g for 15 min at 20°C. Cells were incubated with CD14 MACS microbeads (Miltenyi Biotec) for 15 min and monocytes purified by magnetic sorting. CD14⁺ monocytes, at a density of 1 × 10⁶ cells/ml, were cultured in RPMI-1640 medium supplemented with 10% heat-inactivated foetal bovine serum (FBS) (Biowest), 2 mM L-glutamine, 100 U/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin (Gibco; Thermo Fisher Scientific, Inc.) and 50 µM 2-mercaptoethanol (Sigma-Aldrich; Merck KGaA), at pH 7.2 (R-10 medium). Cells were seeded in 24-well tissue culture-treated plates (Corning) and left to rest all night at 37°C in a humid atmosphere with 5% CO₂. On the next day, 50% of the medium was replaced with medium for moDC differentiation, composed by R-10 supplemented with the necessary cytokines to induce the differentiation of moDC: 1000 U/ml IL-4 and 500 U/ml GM-CSF (BD Biosciences). On days 2, 4 and 6, 50% of the medium was removed from the wells and replaced with fresh medium and cytokines. On day 7, non-adherent cells were harvested and used for the experiments. By flow cytometry, cells were generally 80%–90% CD209⁺CD14[−] and had an immature phenotype: CD80^{int}CD86^{int}MHCII^{int}.

2.2 | Culture of *Leishmania mexicana*

L. mexicana, Lac strain (MHOM/MX/2011/LAC), was used throughout the experiments and was chosen for its importance as causal agent of cutaneous leishmaniasis in Mexico. Lac strain was isolated and characterized by our group from a Mexican patient diagnosed with LCL.²² To maintain the virulence of the strain, susceptible Balb/c mice were inoculated periodically in the right hind footpad with 1 × 10⁷ stationary-phase axenically cultured amastigotes. Once the footpad lesion developed, mice were sacrificed and amastigotes isolated from the infected tissue and cultured as axenic amastigotes as described

previously,²³ with minor modifications. Infected foot was macerated through a 100 mm nylon mesh (Falcon; Corning) with the plunger of a 10 ml syringe in the presence of Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (D-PBS) supplemented with 200 U/ml penicillin and 200 µg/ml streptomycin. The obtained homogenate was centrifuged at 100 × g for 5 min at 20°C to pellet tissue debris, while amastigotes were recovered from the supernatant by centrifugation at 2000 × g for 10 min at 20°C and washed with D-PBS. Isolated amastigotes were seeded for axenic culture in 25 cm² tissue culture flasks at a density of 1 × 10⁵ parasites/ml in Grace's insect medium (Gibco; Thermo Fisher Scientific, Inc.), supplemented with 20% FBS, 100 U/ml penicillin and 100 µg/ml streptomycin, at pH 5.4, and cultured at 33°C. Subcultures were performed every 7 days. Only cultures with less than five passages after isolation from mouse footpad lesions were used throughout the study. *L. mexicana* promastigotes were obtained by transformation at 26°C of axenically cultured amastigotes (5 × 10⁵ cells/ml) in Medium 199 (Sigma-Aldrich; Merck KGaA) supplemented with 10% FBS, 100 U/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin, and 2 mM L-glutamine, at pH 7.2. For assays, promastigote cultures were enriched with metacyclic forms as described previously,²⁴ with minor modifications. For this, 1 × 10⁵ promastigotes from logarithmic phase of growth (day 2–3 of culture) were subcultured in Grace's insect medium supplemented with 10% FBS, 100 U/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin, and 2 mM L-glutamine, at pH 5.4. Enriched-metacyclic promastigotes were harvested during the stationary phase of culture, washed three times with D-PBS, and counted using a haemocytometer after fixing in 2% paraformaldehyde solution in D-PBS. Using this method, we obtained during the stationary phase of culture a homogenous and reproducible population containing over 90% metacyclic promastigotes characterized by morphology and infection ability.

2.3 | moDC infection and treatment

A total of 1 × 10⁶ moDC/ml were seeded in 24-well tissue culture plates and incubated with *L. mexicana* metacyclic promastigotes at 10:1 (promastigotes/moDC) ratio for 2 h at 26°C in order to promote infection of the cells. Afterwards, moDC were treated with CPT, an inductor of the mitochondrial pathway of apoptosis, and/or with the inhibitor VIII, a specific inhibitor of Akt (Sigma-Aldrich; Merck KGaA). Both were used at a concentration of 10 µM for 12 h at 37°C in a humid atmosphere with 5% CO₂.

2.4 | Survival of amastigotes released from moDC

In order to establish if the treatment of infected moDC with CPT or the Akt inhibitor affected the parasite, the percentage of survival of amastigotes released from moDC was determined 12 h after the cells were infected with *L. mexicana* metacyclic promastigotes and treated with CPT and/or Akt inhibitor. Infected and stimulated moDC were washed with R-10 and centrifuged at 500 × g for 10 min at 4°C. Cells were then incubated with 0.01% SDS for 10 min at 37°C with 5% CO₂.

Later, supplemented Medium 199 was added and the suspension was centrifuged at 3000 × g for 10 min at room temperature. Amastigotes that were released from moDC were cultured in supplemented Medium 199 for 4 days at 26°C. On the fourth day of culture, the total number of promastigotes that transformed from viable amastigotes was determined by counting the parasites in a haemocytometer.

2.5 | Evaluation of the MOMP in moDC

After moDC were infected with *L. mexicana* metacyclic promastigotes and treated with CPT and/or Akt inhibitor we proceeded to evaluate the MOMP. For this, we used the fluorochrome 3,3'-Dihexyloxycarbocyanine iodide (DiOC6) (Sigma-Aldrich; Merck KGaA), which is a cationic lipophilic cyanine that easily permeates to the mitochondrial matrix where it is sequestered due to the negative charge of the matrix. Nevertheless, when the MOMP occurs, the electric potential dissipates and therefore the fluorochrome, that stains intensely live cells, releases from apoptotic cells, which gradually lose colour.^{25,26} moDC were stained with 100 µl of 100 µM DiOC6 for 10 min at 37°C. Afterwards, cells were washed with D-PBS and analysed in a FACSCalibur (BD Biosciences) flow cytometer and data were analysed with FlowJo software (BD Biosciences).

2.6 | Western blot for caspase 3, Bcl-2, Mcl-1 and Bcl-xL

Infected and stimulated moDC were washed three times with D-PBS after centrifugation at 400 × g for 10 min at 4°C. Afterwards, cells were incubated with 40 µl of lysis buffer (25 mM Tris-HCl, pH 7.6, 150 mM NaCl, 1% NP-40, 1% sodium deoxycholate and 0.1% SDS), supplemented with EDTA-free protease inhibitor cocktail (Roche Diagnostics GmbH) for 15 min. Then, samples were centrifuged at 14,000 × g for 10 min at 4°C and the supernatant (total extract) was recovered and kept at –70°C. Protein concentration was assessed using the bicinchoninic acid protein assay kit (Novagen; Merck KGaA). Protein profiles were resolved through 12% SDS-PAGE gels. An amount of 40 µg of protein was loaded for each condition and electrophoresis was carried out at 120 V for 90 min. Afterwards, proteins resolved in the acrylamide gel were electrotransferred to Immobilon-P membranes (Millipore; Merck, KGaA) at 20 V for 45 min employing a semi-dry electrotransference chamber (Bio-Rad Laboratories). After transference, membranes were blocked for 30 min with 5% nonfat dried milk (Bio-Rad Laboratories) dissolved in TBST (10 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, and 0.05% Tween 20, pH 7.4) for 30 min. Then, membranes were washed (three times, 5 min each) with TBST and incubated overnight at 4°C with the following primary antibodies: 1:3000 monoclonal rabbit anti-caspase 3 (Chemicon; Merck KGaA) to detect the 32 kDa-zymogen or 1:500 to detect the 17 kDa active fragment, 1:1000 mouse monoclonal antibody anti-Bcl-2, Mcl-1, Bcl-xL or actin (Santa Cruz Biotechnology) diluted in TBST containing 10% nonfat dried milk. Then, membranes were washed with TBST (three times, 5 min each), and incubated for 60 min at room temperature with either

1:5000 horseradish peroxidase (HRP)-conjugated horse anti-mouse IgG or 1:10,000 HRP conjugated goat anti-rabbit IgG secondary antibodies (Cell Signalling Technology, Inc.) diluted in TBST containing 5% nonfat dried milk. After incubation with secondary antibodies, membranes were washed with TBST (three times, 10 min each) and developed with a chemiluminescent substrate for HRP (Millipore-Merck KGaA). Chemiluminescence was evaluated and photodocumented with a ChemiDoc MP (Bio-Rad Laboratories). Densitometric analyses of bands were performed using the Image Lab 6.1 (Bio-Rad Laboratories).

2.7 | Data analysis

Data are reported as the mean \pm standard error of the mean (SEMs) and were analysed using GraphPad Prism 6.0 software (GraphPad Software, Inc.). Statistical differences between groups were evaluated using one-way analyses of variance (ANOVAs) followed by Tukey post hoc test for multi-pair comparisons. Differences between groups were considered significant when P value was $<.05$.

3 | RESULTS

3.1 | *L. mexicana* viability inside moDC is not affected by CPT or Akt inhibitor

moDC were infected with *L. mexicana* metacyclic promastigotes and treated with CPT and/or an Akt specific inhibitor. To ensure that *L. mexicana* parasites remained viable after being phagocytosed by moDC and exposed both to CPT and/or Akt inhibitor, viability assays were performed. Briefly, promastigotes phagocytosed by moDC that transformed to amastigotes were released from the cells by the action of SDS and incubated in Medium 199 with 10% FBS at 24°C for 4 days. Only viable amastigotes can transform to promastigotes and thus the total number of promastigotes was determined as a viability parameter. Our results show that the number of promastigotes that transformed from amastigotes released from moDC treated with the Akt inhibitor was similar to the number of promastigotes that transformed from amastigotes obtained from untreated moDC (Figure 1, Table 1). On the other hand, the number of promastigotes that transformed from amastigotes released from CPT-treated moDC and CPT plus Akt inhibitor-treated cells was lower than the number of promastigotes that transformed from amastigotes released from moDC treated only with the Akt inhibitor (Figure 1, Table 1). Although the decrease was statistically significant, the number of promastigotes counted could let us conclude that the treatment does not affect the parasites viability in an important manner.

3.2 | Akt inhibitor prevents the inhibition of MOMP in infected and CPT-treated moDC

During apoptosis, MOMP is a point of no return since lethal processes for the cell are triggered leading to the activation of executioner

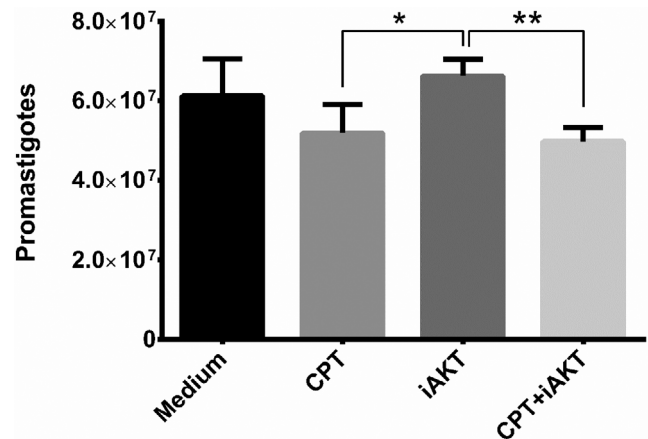


FIGURE 1 The treatment of monocyte-derived dendritic cells (moDC) with camptothecin or Akt inhibitor does not affect intracellular amastigotes viability. moDC were infected with *Leishmania mexicana* metacyclic promastigotes and treated with camptothecin and/or an Akt specific inhibitor. Intracellular amastigotes were released from moDC with a mild SDS treatment and seeded in culture medium. The number of promastigotes transformed from viable amastigotes after 4 days in culture was determined. Data are expressed as the mean \pm SEM and are representative of at least five independent experiments. * $P \leq .05$, ** $P \leq .01$

caspsases and dismantling of the cell. Thus, MOMP is an excellent apoptotic marker.²⁷ To determine MOMP in moDC, cells were stained with the fluorochrome DIOC6, which intensely stains viable cells while it is released in apoptotic cells due to the dissipation of the potential of the mitochondrial membrane.²⁶ Our results show that CPT significantly increases the MOMP, while the co-incubation with the Akt inhibitor acts synergistically and increases the percentage of apoptotic cells where MOMP has occurred. Besides, in infected moDC the increase in the MOMP, induced by CPT is inhibited, which is prevented with the inhibition of Akt (Figure 2A). Although, and in a very interesting way, the percentage of MOMP in infected moDC and treated with both drugs was significantly lower as compared to moDC treated only with the drugs (Figure 2B). This suggests that *L. mexicana* might interfere with other signalling pathways in addition to Akt.

3.3 | Akt inhibitor prevents the inhibition of caspase 3 activation in infected moDC

In addition to MOMP, we decided to evaluate caspase 3 activation as another apoptotic parameter. moDC were infected with *L. mexicana* promastigotes and treated with CPT and/or Akt inhibitor, lysed, and assessed for the presence of the zymogen or active caspase 3 by Western blot (Figure 3A). As we previously reported,^{15,17,18} the infection of moDC with *L. mexicana* significantly decreased the activation of caspase 3 induced by CPT (Figure 3B). In order to elucidate if the Akt pathway participates in the decrease of caspase 3 activation we used a specific inhibitor for this kinase. Our results show that the

TABLE 1 *Leishmania mexicana* promastigotes transformed and grown from viable amastigotes harboured in infected monocyte-derived dendritic cells

Experiment	Medium	CPT	iAKT	CPT + iAKT
1	53,625,000	43,375,000	69,875,000	48,875,000
2	75,875,000	57,500,000	69,000,000	45,500,000
3	65,000,000	60,750,000	68,875,000	50,000,000
4	56,125,000	50,250,000	62,000,000	55,250,000
5	55,625,000	47,875,000	61,250,000	49,500,000
Mean	61,250,000	51,950,000	66,200,000	49,825,000
SEM	±4,147,288	±3,172,292	±1,879,412	±1,568,040

Abbreviations: CPT, camptothecin; iAKT, inhibitor of AKT; SEM, standard error of the mean.

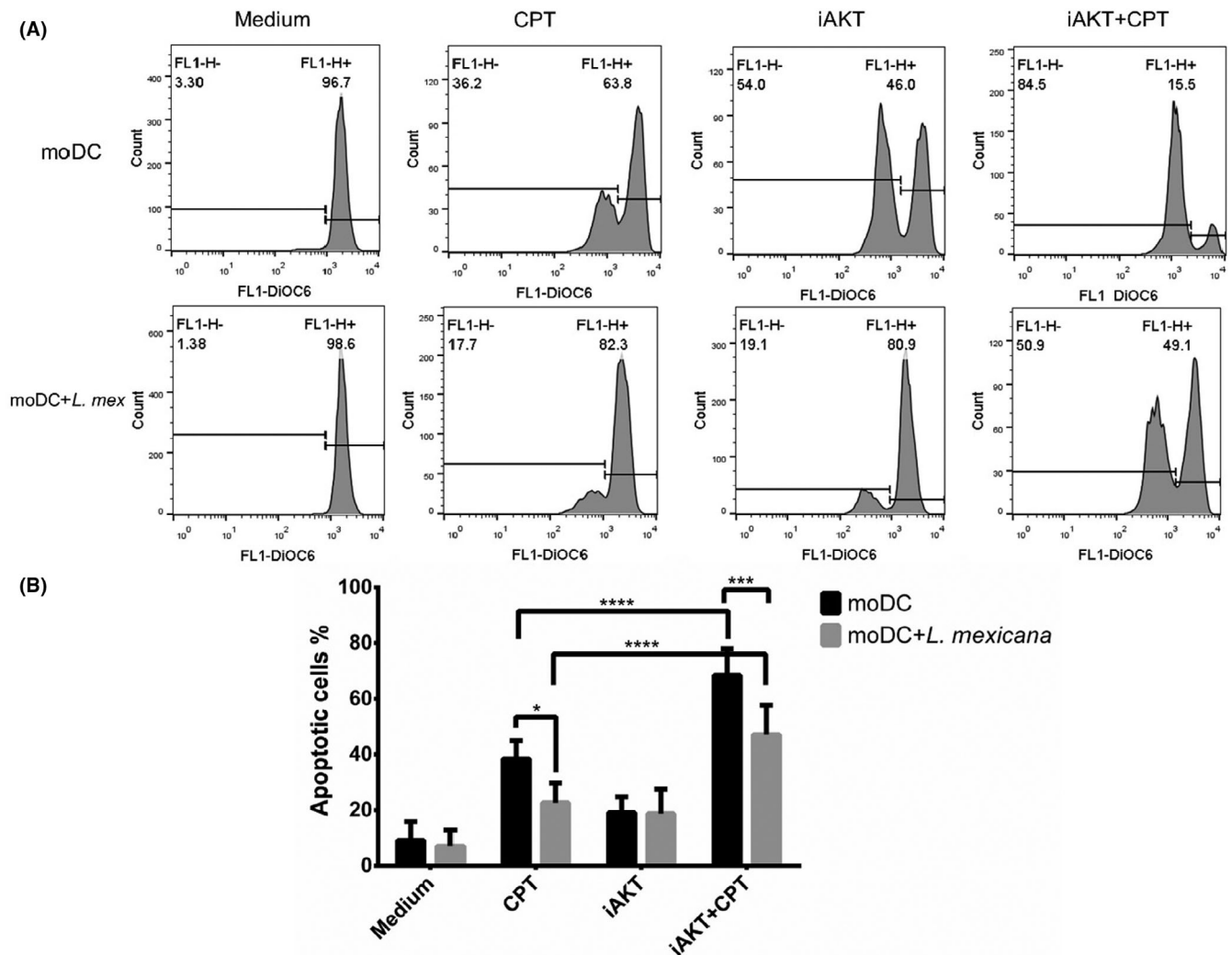


FIGURE 2 Akt participates in the inhibition of mitochondrial outer membrane permeabilization (MOMP) in monocyte-derived dendritic cells (moDC) infected with *Leishmania mexicana* promastigotes. moDC were infected with *L. mexicana* metacyclic promastigotes and treated with camptothecin and/or an Akt specific inhibitor. MOMP was evaluated by flow cytometry using DiOC6. (A) Histograms depict fluorescence intensity of moDC stained with the fluorochrome DiOC6. moDC treated with the different drugs show two different populations, one with a lower fluorescence intensity that corresponds to apoptotic cells and another with a higher fluorescence intensity that corresponds to viable moDC. (B) Percentages of apoptotic cells are expressed as the mean \pm SEM and are representative of at least six independent experiments. (* $P < .05$, *** $P < .0001$, **** $P < .00001$, $n = 6$)

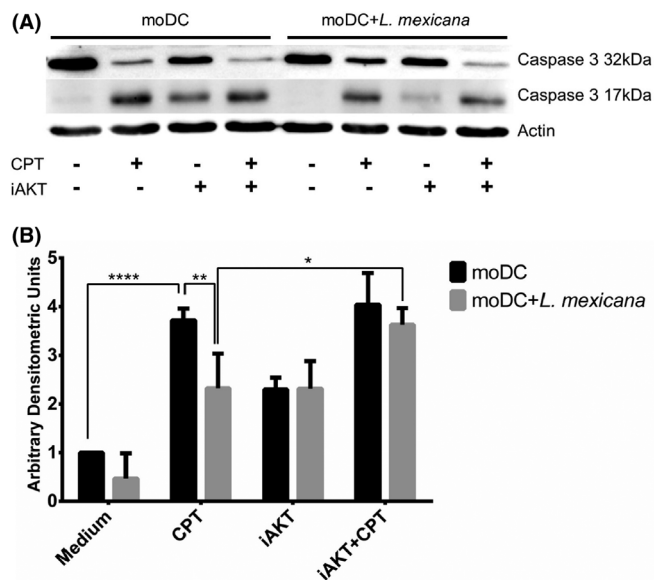


FIGURE 3 The inhibition of Akt prevents the inhibition of caspase 3 activation in infected monocyte-derived dendritic cells (moDC). moDC were infected with *Leishmania mexicana* metacyclic promastigotes and treated with camptothecin (CPT) and/or an Akt specific inhibitor. Cells were lysed and the activation of caspase 3 was assayed by Western blot. (A) Caspase 3 zymogen (32 kD) diminishes with the exposition to CPT and iAKT, while the expression of active caspase 3 (17 kD) increases. (B) Relative levels of zymogen and active caspase 3 were measured by densitometric analysis and values represent the mean \pm S.D. of four independent experiments. (**P* < .05, ***P* < .001, *****P* < .00001)

inhibition of Akt prevents the decrease in caspase 3 activation, induced by CPT, in infected moDC (Figure 3B).

3.4 | The infection of moDC with *L. mexicana* promastigotes induces a decrease in Bcl-2

The proteins of the Bcl-2 family are the principal regulators of MOMP during apoptosis. They are characterized by the presence of the homology domain Bcl-2 (BH) and can be divided in anti-apoptotic, effector proapoptotic, and proapoptotic that only present the BH3 domain. Bcl-2 is an antiapoptotic protein in charge of regulating MOMP through the inactivation of proapoptotic proteins.²⁸ It has been shown that the infection with *Leishmania*, both in human neutrophils and in human and murine macrophages, induces an increase in Bcl-2, which is associated with the inhibition of apoptosis in these host cells.^{7,9,29} Due to this, we decided to analyse if the infection of moDC with *L. mexicana* metacyclic promastigotes increases Bcl-2 and if Akt participates. Infected and treated moDC were lysed and the protein presence of Bcl-2 was determined by Western blot (Figure 4A). Contrarily to what was expected, our results showed that the infection of moDC diminished Bcl-2 even in the presence of CPT, Akt inhibitor, or both (Figure 4A,B).

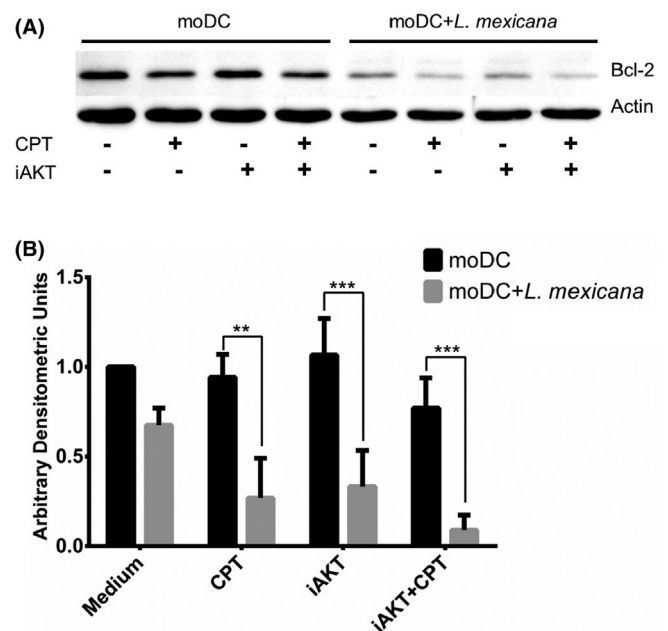


FIGURE 4 The infection of monocyte-derived dendritic cells (moDC) with *Leishmania mexicana* promastigotes induces a decrease in Bcl-2. moDC were infected with *L. mexicana* metacyclic promastigotes and treated with camptothecin and/or an Akt specific inhibitor. (A) Cells were lysed and the presence of Bcl-2 was assayed by Western blot. (B) Relative levels of Bcl-2 were measured by densitometric analysis and values represent the mean \pm S.D. of four independent experiments. (***P* < .001, ****P* < .0001)

3.5 | The infection of moDC with *L. mexicana* induces a change of isoform of Mcl-1

In murine macrophages infected with *L. mexicana* promastigotes it has been observed an increase in Mcl-1 gene expression and protein presence.⁸ For this reason, we decided to analyse if the infection of moDC with *L. mexicana* metacyclic promastigotes increased Mcl-1 protein presence in the context of Akt inhibition. Our results showed that the infection of moDC with *L. mexicana* promastigotes induced a change in Mcl-1 isoform. While in unstimulated moDC only the presence of Mcl-1 was observed, in infected moDC the isoform that was found was Mcl-1S. Moreover, when moDC, both infected and uninfected, were incubated with CPT it was not possible to observe any Mcl-1 isoforms (Figure 5).

3.6 | The inhibition of Akt prevents the increase of Bcl-xL in infected moDC

Previously, our group demonstrated that the infection of moDC with *L. mexicana* metacyclic promastigotes increases Bcl-xL protein presence.¹⁷ Nevertheless, in this work we did not analyse the possibility that this increase was related with our previous results about Akt activation in moDC.¹⁹ Due to the fact that our results showed that the infection of moDC did not induce an increase in Bcl-2 nor Mcl-1, we decided to return to the previous result on Bcl-xL and analyse it in the

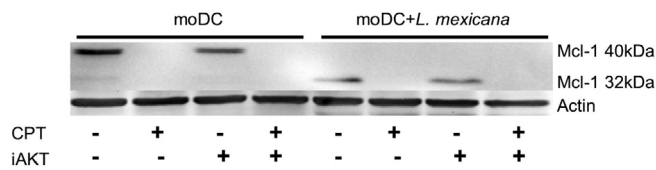


FIGURE 5 The infection of monocyte-derived dendritic cells (moDC) with *Leishmania mexicana* induces a change of isoform of Mcl-1. moDC were infected with *L. mexicana* metacyclic promastigotes and treated with camptothecin and/or an Akt specific inhibitor. Cells were lysed and the presence of Mcl-1 was assayed by Western blot

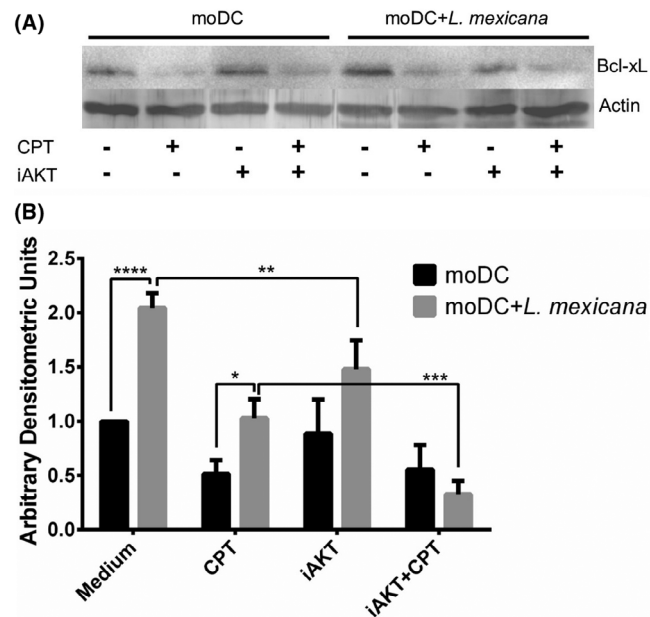


FIGURE 6 The inhibition of Akt prevents the increase of Bcl-xL in infected monocyte-derived dendritic cells (moDC). moDC were infected with *L. mexicana* metacyclic promastigotes and treated with camptothecin and/or an Akt specific inhibitor. (A) Cells were lysed and the presence of Bcl-xL was assayed by Western blot. (B) Relative levels of Bcl-xL were measured by densitometric analysis and values represent the mean ± S.D. of four independent experiments. (* $P < .05$, ** $P < .001$, *** $P < .0001$, **** $P < 0.00001$)

context of inhibition of the Akt signal transduction pathway. As previously shown, the infection of moDC with *L. mexicana* metacyclic promastigotes induced an increase in Bcl-xL protein presence, while in uninfected moDC this protein drastically diminished in the presence of CPT. Interestingly, the inhibition of Akt prevented Bcl-xL increase induced by infection of moDC with *L. mexicana* promastigotes (Figure 6). This result suggests that the increase in the protein presence of Bcl-xL is regulated by the activation of Akt transduction pathway.

4 | DISCUSSION

The infection of host cells with different *Leishmania* species inhibits both natural and induced apoptosis with different stimuli.^{7,18,30,31} In

the present work, we analysed if during the inhibition of apoptosis of moDC infected with *L. mexicana* metacyclic promastigotes an increase in the apoptotic proteins Bcl-2, Mcl-1 and Bcl-xL occurs through the activation of Akt transduction pathway. Other obligate intracellular parasites such as *Toxoplasma gondii*, *Plasmodium berghei* and *Trypanosoma cruzi*, just to mention a few, are also capable of inhibiting host cell apoptosis.³²⁻³⁴ Besides, both in infected cells with *T. gondii* as in those infected with *T. cruzi* there is an increase in antiapoptotic proteins of the Bcl-2 family.^{35,36} On the other hand, it has been shown that different *Leishmania* species induce an increase in antiapoptotic proteins such as Bcl-2, Bcl-xL, Bfl-1 and Mcl-1 in host cells such as macrophages and neutrophils.^{6-9,29} One of the signalling pathways that has been shown to participate in the infection of cells with *Leishmania* is Akt and when this kinase is inhibited, the inhibition of apoptosis is prevented.^{12,13,37} We previously demonstrated that the infection of moDC with *L. mexicana* induces an increase in Bcl-xL¹⁷ and that, in addition, activates the Akt pathway.¹⁹ Nevertheless, it has not been established a direct relation between Akt activation and the increase in the antiapoptotic proteins of the Bcl-2 family during the inhibition of apoptosis of moDC infected with *Leishmania*.

Our first aim was to demonstrate that *L. mexicana* parasites remain viable after being phagocytosed by moDC and exposed to the inducer of apoptosis, CPT, and to a specific inhibitor of Akt since other studies have demonstrated that only viable parasites are capable of inhibiting apoptosis³⁸ and this happens not only with *Leishmania*, but with other parasites such as *T. gondii*.³⁹ After infecting moDC with *L. mexicana* metacyclic promastigotes and stimulate them with an Akt inhibitor and CPT for 12 h, intracellular amastigotes were released from the cells with a mild treatment with SDS and seeded in supplemented culture medium. After 4 days of culture, only viable amastigotes could be transformed into promastigotes and they were able to reproduce. When estimating the total number of promastigotes for each experimental condition, we found that there are no significant differences between the number of promastigotes obtained from untreated moDC as compared to moDC treated with CPT, Akt inhibitor, or both. This result let us conclude that the observed changes in moDC are due to infection with viable parasites and not to an artefact in the experimental design.

PI3K/Akt is one of the most important pathways that control many cellular processes including, cell division, autophagy, survival and differentiation. The Akt pathway has not been shown to be directly related to the inhibition of apoptosis in moDC infected with *L. mexicana*. Although previously we showed that the infection of moDC with *L. mexicana* induces Akt activation, we were not able to establish a direct relation with the inhibition of apoptosis of moDC.¹⁹ Thus, we pursued to specifically inhibit Akt and analyse crucial apoptotic events such as MOMP and caspase 3 activation. The analysis of MOMP by flow cytometry showed that CPT increases MOMP in moDC, while the infection with *L. mexicana* promastigotes inhibits it. Nevertheless, when Akt was inhibited in infected and CPT-treated moDC, the percentage of apoptotic cells is like uninfected moDC treated with CPT, which can suggest the participation of other signalling pathways. One of these pathways could be ERK 1/2, whose role in the inhibition of

apoptosis was demonstrated in neutrophils infected *L. major*. The pharmacological inhibition of ERK 1/2 reverts the inhibition of apoptosis in infected neutrophils,⁷ so it would be interesting to analyse if the Akt pathway acts in conjunction with ERK 1/2 to inhibit apoptosis in *L. mexicana*-infected moDC. Nevertheless, when Akt is inhibited, the inhibition of MOMP in infected moDC is prevented. Furthermore, the analysis of caspase 3 activation by Western blot revealed that in infected moDC and treated with CPT the activation of caspase 3 is inhibited, while the Akt inhibitor prevents the inhibition of caspase 3 in infected moDC and treated with CPT. These data shed light on the relevant role of the manipulation of Akt pathway for *Leishmania* to achieve the inhibition of apoptosis of moDC which coincides with what has been reported previously in macrophages infected with *L. donovani*.^{12,13}

In addition to the manipulation of Akt pathway by *Leishmania* as a mechanism to inhibit apoptosis of host cells, the parasite has also the capacity to modulate antiapoptotic proteins of the Bcl-2 family. This modulation is not restricted to *Leishmania* since other intracellular parasites possess this ability. It has been shown that in cells infected with *T. gondii* an antiapoptotic balance is maintained, since the protein presence of Bcl-2 is increased while that of Bax and Bad decreases.⁴⁰ In addition to this, in infected cells, the phosphorylation of Bad is also prevented through PI3K,⁴¹ which suggests the importance of the activation of the PI3K/Akt pathway for the inhibition of apoptosis. In the case of another intracellular parasite, *T. cruzi*, the treatment of cells with a *T. cruzi* transalidase increased Bcl-2 protein presence, while specifically inhibiting PI3K prevents this increase.⁴² Also, the treatment of cells with another protein derived from *T. cruzi*, cruzipain, increases the protein presence of Bcl-2 and Bcl-xL, while the specific inhibition of MEK1 prevents Bcl-2 increase and the specific inhibition of PI3K reduces Akt phosphorylation while increasing the number of apoptotic cells.^{35,43} These findings led us to investigate if the infection of moDC with metacyclic promastigotes of *L. mexicana* increases the protein presence of Bcl-2 and Mcl-1 and if this increase is modulated by the activation of Akt. Our results show that, contrarily to what was expected, the infection of moDC with *L. mexicana* promastigotes not only did not increase the presence of Bcl-2 or Mcl-1, but it dramatically decreased, regardless of whether the moDC were treated with CPT, with the Akt inhibitor, or with both. Nevertheless, this unexpected result has also been observed in a different model. It has been shown that the infection of astrocytes with *T. gondii* diminishes protein presence of the antiapoptotic proteins Bcl-2 and survivin, while the expression of proapoptotic genes such as noxa increases. Nevertheless, apoptotic parameters such as chromatin condensation and activity of caspase 3 and 7 are inhibited.⁴⁴ In addition, we not only observed a decrease in the presence of Mcl-1 in infected moDC, but interestingly there was a change in the isoform of Mcl-1 observed between infected and uninfected moDC. As previously mentioned, Mcl-1 is an antiapoptotic protein of the Bcl-2 family, however, it shows substantial differences with respect to other antiapoptotic proteins due to the fact that presents at least three isoforms that result from alternative splicing. The best-known isoform is Mcl-1 L or simply Mcl-1, which is the bigger one with a molecular weight of

approximately 40 kDa and of the three isoforms it is the only one with antiapoptotic activity. Mcl-1 possesses the four BH domains, one transmembrane domain, a mitochondrial signalling domain (MTS), and a PEST sequence, which is characteristic of short half-life proteins. By size, the second isoform is Mcl-1S with an approximate molecular weight of 32 kDa. It is formed by the elimination of exon 2, which at the protein level translates into loss of the BH1, BH2 and transmembrane domains. Thus, Mcl-1S possesses proapoptotic activity and is mainly found in the cytosol. The third known isoform is Mcl-1ES, which is the smallest of the three because it only contains 197 amino acids. It is formed by the loss, in part, of exon 1, which results in the loss of the PEST and BH4 domains, although conserves the BH1-BH3 and transmembrane domains. Nevertheless, under physiologic conditions no biological function has been observed.⁴⁵

In the case of the infection of different cells with one *Leishmania* species it is possible to induce or inhibit apoptotic features depending on the type of cell.⁴⁶ This suggests, that although these parasites are capable of inhibiting host cell apoptosis, they also have the ability to down regulate antiapoptotic proteins, since they do not exert a blockade of apoptosis, but a delay until they are able to reproduce within the host cell. This hypothesis is supported by data obtained with human neutrophils infected with *L. major* promastigotes where it was observed that the apoptosis in these cells is delayed for approximately 24 h.³⁸ Besides, during longer infection periods, 48–72 h, different *Leishmania* species such as *L. aethiopica*, *L. tropica* and *L. major* induce host cell apoptosis.⁴⁷ The biological explanation for these differences may reside in the fact that the inhibition of apoptosis for short infection times results beneficial for the parasite as it manages to reproduce. On the other hand, at longer infection periods, the parasite benefits from inducing apoptosis as it manages to infect neighbouring cells. In addition, this biologic significance is supported by the fact that macrophages that engulf infected apoptotic neutrophils infected with *L. major* do not recognize the parasite and therefore are not activated, which gives them a great advantage in establishing the infection in the mammalian host.⁴⁸ Moreover, it has been shown that both *L. aethiopica* promastigotes and amastigotes that are phagocytosed by macrophages become covered with the cell membrane of apoptotic macrophages, which would again give them the possibility to invade neighbouring cells without activating them.⁴⁹ Based on the above, the decrease of Bcl-2 and Mcl-1 in infected moDC could be associated with the subsequent induction of apoptosis for the release of parasites and silent invasion of neighbouring cells, however, more studies are needed to support this hypothesis.

We have previously shown that the infection of moDC with *L. mexicana* metacyclic promastigotes induces an increase in the protein Bcl-xL¹⁷ and since the results obtained with Bcl-2 and Mcl-1 did not show an increase, we decided to analyse the increase in Bcl-xL in the context of Akt inhibition. Our results corroborate what we previously reported that the infection of moDC induces an increase in the antiapoptotic protein Bcl-xL. However, inhibition of Akt reduces the increase in Bcl-xL protein. Bcl-xL can inhibit apoptosis through binding to proapoptotic proteins, keeping them sequestered in the cytosol, or through binding of p53.⁵⁰ When DNA is damaged, p53 induces the

expression of PUMA and in the cytosol, PUMA interferes with the binding of Bcl-xL and p53.⁵¹ Once p53 is free in the cytosol it can directly activate Bax⁵² or Bak⁵³ so that finally, the latter, start the MOMP. Since CPT induces apoptosis through DNA damage, it is possible that infection of moDCs with metacyclic promastigotes promotes the increase of Bcl-xL to prevent MOMP through the p53/Bax/Bak pathway, however, more studies are needed to prove this hypothesis.

In the present work, we showed that in moDC infected with metacyclic promastigotes of *L. mexicana*, the presence of active Akt kinase is necessary to achieve inhibition of apoptosis induced with CPT together with an increase of the antiapoptotic protein Bcl-xL. Furthermore, we demonstrated that infection of moDC induces a decrease in Bcl-2 and a change in the isoform of Mcl-1. However, more studies are needed to understand the reason for the decrease in Bcl-2 and Mcl-1.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by grant IN218119 from PAPIIT, DGAPA, UNAM, to Laila Gutiérrez-Kobeh. Jorge Rodríguez-González is a doctoral student from Programa de Doctorado en Ciencias Biológicas, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), and received a fellowship from CONACYT and from grant IN218119 from PAPIIT, DGAPA, UNAM. We thank Dr. Ana María Mejía Domínguez, Jefa de Servicio, Banco de Sangre del Instituto Nacional de Cardiología 'Ignacio Chávez' for kindly providing the buffy coats for the purification of the cells. We also thank Dr. Felipe A. Massó for the facilities provided to use the flow cytometer. Jorge Rodríguez-González participated in the design of the project, conducted the majority of the experiments, and contributed in the writing of the manuscript. Arturo A. Wilkins-Rodríguez contributed with the culture of the parasites, participated in some experiments, and in the revision of the manuscript. Laila Gutiérrez-Kobeh participated in the design of the project, in the writing of the manuscript, and received the financial support for the project.

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no conflict of interests.

DATA AVAILABILITY STATEMENT

The data that support the findings of this study are openly available in our laboratory files.

ORCID

Jorge Rodríguez-González  <https://orcid.org/0000-0003-3697-9372>

Laila Gutiérrez-Kobeh  <https://orcid.org/0000-0002-4414-6437>

REFERENCES

- Murray HW, Berman JD, Davies CR, Saravia NG. Advances in leishmaniasis. *Lancet*. 2005;366:1561-1577. doi:10.1016/S0140-6736(05)67629-5
- Burza S, Croft SL, Boelaert M. Leishmaniasis. *Lancet*. 2018;392:951-970. doi:10.1016/S0140-6736(18)31204-2
- Galluzzi L, Vitale I, Abrams JM, et al. Molecular definitions of cell death subroutines: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2012. *Cell Death Differ*. 2012;19:107-120. doi:10.1038/cdd.2011.96
- Kale J, Osterlund EJ, Andrews DW. BCL-2 family proteins: changing partners in the dance towards death. *Cell Death Differ*. 2018;25:65-80. doi:10.1038/cdd.2017.186
- Elmore S. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol*. 2007;35:495-516. doi:10.1080/01926230701320337
- Donovan MJ, Maciuba BZ, Mahan CE, McDowell MA. Leishmania infection inhibits cycloheximide-induced macrophage apoptosis in a strain-dependent manner. *Exp Parasitol*. 2009;123:58-64. doi:10.1016/j.exppara.2009.05.012
- Sarkar A, Aga E, Bussmeyer U, et al. Infection of neutrophil granulocytes with *Leishmania major* activates ERK 1/2 and modulates multiple apoptotic pathways to inhibit apoptosis. *Med Microbiol Immunol*. 2013;202:25-35. doi:10.1007/s00430-012-0246-1
- Giri J, Srivastav S, Basu M, Palit S, Gupta P, Ukil A. *Leishmania donovani* exploits myeloid cell leukemia 1 (MCL-1) protein to prevent mitochondria-dependent host cell apoptosis. *J Biol Chem*. 2016;291:3496-3507. doi:10.1074/jbc.M115.672873
- Pandey RK, Mehrotra S, Sharma S, Guddu RS, Sundar S, Shaha C. *Leishmania donovani*-induced increase in macrophage Bcl-2 favors parasite survival. *Front Immunol*. 2016;7:456. doi:10.3389/fimmu.2016.00456
- Manning BD, Toker A. AKT/PKB signaling: navigating the network. *Cell*. 2017;169:381-405. doi:10.1016/j.cell.2017.04.001
- Zhang X, Tang N, Hadden TJ, Rishi AK. Akt, FoxO and regulation of apoptosis. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Res*. 2011;1813:1978-1986. doi:10.1016/j.bbamcr.2011.03.010
- Gupta P, Srivastav S, Saha S, Das PK, Ukil A. *Leishmania donovani* inhibits macrophage apoptosis and pro-inflammatory response through AKT-mediated regulation of β -catenin and FOXO-1. *Cell Death Differ*. 2016;23:1815-1826. doi:10.1038/cdd.2016.101
- Ruhland A, Leal N, Kima PE. *Leishmania* promastigotes activate PI3K/Akt signalling to confer host cell resistance to apoptosis. *Cell Microbiol*. 2007;9:84-96. doi:10.1111/j.1462-5822.2006.00769.x
- von Stebut E, Tenzer S. Cutaneous leishmaniasis: distinct functions of dendritic cells and macrophages in the interaction of the host immune system with *Leishmania major*. *Int J Med Microbiol*. 2018;308:206-214. doi:10.1016/j.ijmm.2017.11.002
- Gutiérrez-Kobeh L, Rodríguez-González J, Vázquez-López R, Wilkins-Rodríguez A. Signaling pathways targeted by protozoan parasites to inhibit apoptosis. In: Tutar Y, ed. *Current Understanding of Apoptosis - Programmed Cell Death*. InTech; 2018. 10.5772/intechopen.76649
- Rodríguez-González J, Wilkins-Rodríguez A, Argueta-Donohué J, Aguirre-García M, Gutiérrez-Kobeh L. *Leishmania mexicana* promastigotes down regulate JNK and p-38 MAPK activation: role in the inhibition of camptothecin-induced apoptosis of monocyte-derived dendritic cells. *Exp Parasitol*. 2016;163:57-67. doi:10.1016/j.exppara.2015.12.005
- Rodríguez-González J, Wilkins-Rodríguez AA, Gutiérrez-Kobeh L. Role of glutathione, ROS, and Bcl-xL in the inhibition of apoptosis of monocyte-derived dendritic cells by *Leishmania mexicana* promastigotes. *Parasitol Res*. 2018;117:1225-1235. doi:10.1007/s00436-018-5804-z
- Valdés-Reyes L, Argueta J, Morán J, et al. *Leishmania mexicana*: inhibition of camptothecin-induced apoptosis of monocyte-derived dendritic cells. *Exp Parasitol*. 2009;121:199-207. doi:10.1016/j.exppara.2008.10.020
- Vázquez-López R, Argueta-Donohué J, Wilkins-Rodríguez A, Escalona-Montaño A, Aguirre-García M, Gutiérrez-Kobeh L. *Leishmania mexicana* amastigotes inhibit p38 and JNK and activate PI3K/AKT: role in the inhibition of apoptosis of dendritic cells. *Parasite Immunol*. 2015;37:579-589. doi:10.1111/pim.12275
- Romani N, Gruner S, Brang D, et al. Proliferating dendritic cell progenitors in human blood. *J Exp Med*. 1994;180:83-93. doi:10.1084/jem.180.1.83
- Sallusto F, Lanzavecchia A. Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage

- colony-stimulating factor plus interleukin 4 and downregulated by tumor necrosis factor alpha. *J Exp Med*. 1994;179:1109-1118. doi:10.1084/jem.179.4.1109
22. Rivera-Fernández I, Argueta-Donohué J, Wilkins-Rodríguez AA, Gutiérrez-Kobeh L. Effect of two different isolates of *Leishmania mexicana* in the production of cytokines and phagocytosis by murine dendritic cells. *J Parasitol*. 2019;105:359. doi:10.1645/17-158
 23. Bates PA, Robertson CD, Tetley L, Coombs GH. Axenic cultivation and characterization of *Leishmania mexicana* amastigote-like forms. *Parasitology*. 1992;105:193-202. doi:10.1017/S0031182000074102
 24. Bates PA, Tetley L. *Leishmania mexicana*: induction of metacyclogenesis by cultivation of promastigotes at acidic pH. *Exp Parasitol*. 1993;76:412-423. doi:10.1006/expr.1993.1050
 25. Chang H-Y, Huang H-C, Huang T-C, Yang P-C, Wang Y-C, Juan H-F. Flow cytometric detection of mitochondrial membrane potential. *Bio-Protocol*. 2013;3:e430. doi:10.21769/BioProtoc.430
 26. Zamzami N, Métivier D, Kroemer G. Quantitation of mitochondrial transmembrane potential in cells and in isolated mitochondria. *Methods in Enzymology*. Academic Press; 2000:208-213. doi:10.1016/S0076-6879(00)22021-1
 27. Kalkavan H, Green DR. MOMP, cell suicide as a BCL-2 family business. *Cell Death Differ*. 2018;25:46-55. doi:10.1038/cdd.2017.179
 28. Luo X, O'Neill KL, Huang K. The third model of Bax/Bak activation: a Bcl-2 family feud finally resolved? *F1000Research*. 2020;9:935. doi:10.12688/f1000research.25607.1
 29. Cianciulli A, Porro C, Calvello R, Trotta T, Panaro MA. Resistance to apoptosis in *Leishmania infantum*-infected human macrophages: a critical role for anti-apoptotic Bcl-2 protein and cellular IAP1/2. *Clin Exp Med*. 2018;18:251-261. doi:10.1007/s10238-017-0482-1
 30. Lisi S, Sisto M, Acquafredda A, et al. Infection with *Leishmania infantum* inhibits actinomycin D-induced apoptosis of human monocytic cell line U-937. *J Eukaryot Microbiol*. 2005;52:211-217. doi:10.1111/j.1550-7408.2005.00026.x
 31. Moore KJ, Matlashewski G. Intracellular infection by *Leishmania donovani* inhibits macrophage apoptosis. *J Immunol*. 1994;152:2930-2937.
 32. Leirião P, Albuquerque SS, Corso S, et al. HGF/MET signalling protects plasmodium-infected host cells from apoptosis. *Cell Microbiol*. 2005;7:603-609. doi:10.1111/j.1462-5822.2004.00490.x
 33. Nakajima-Shimada J, Zou C, Takagi M, Umeda M, Nara T, Aoki T. Inhibition of Fas-mediated apoptosis by *Trypanosoma cruzi* infection. *Biochim Biophys Acta*. 2000;1475:175-183. doi:10.1016/S0304-4165(00)00059-3
 34. Nash PB, Purner MB, Leon RP, Clarke P, Duke RC, Curiel TJ. *Toxoplasma gondii*-infected cells are resistant to multiple inducers of apoptosis. *J Immunol*. 1998;160:1824-1830.
 35. Aoki MP, Guiñazú NL, Pellegrini AV, Gotoh T, Masih DT, Gea S. Cruzipain, a major *Trypanosoma cruzi* antigen, promotes arginase-2 expression and survival of neonatal mouse cardiomyocytes. *Am J Physiol Physiol*. 2004;286:C206-C212. doi:10.1152/ajpcell.00282.2003
 36. Hwang I-Y, Quan JH, Ahn M-H, et al. *Toxoplasma gondii* infection inhibits the mitochondrial apoptosis through induction of Bcl-2 and HSP70. *Parasitol Res*. 2010;107:1313-1321. doi:10.1007/s00436-010-1999-3
 37. Abhishek K, Das S, Kumar A, et al. *Leishmania donovani* induced unfolded protein response delays host cell apoptosis in PERK dependent manner. *PLoS Negl Trop Dis*. 2018;12:1-22. doi:10.1371/journal.pntd.0006646
 38. Aga E, Katschinski DM, van Zandbergen G, et al. Inhibition of the spontaneous apoptosis of neutrophil granulocytes by the intracellular parasite *Leishmania major*. *J Immunol*. 2002;169:898-905. doi:10.4049/jimmunol.169.2.898
 39. Goebel S, Lüder CGK, Gross U. Invasion by *Toxoplasma gondii* protects human-derived HL-60 cells from actinomycin D-induced apoptosis. *Med Microbiol Immunol*. 1999;187:221-226. doi:10.1007/s004300050096
 40. Carmen JC, Hardi L, Sinai AP. *Toxoplasma gondii* inhibits ultraviolet light-induced apoptosis through multiple interactions with the mitochondrion-dependent programmed cell death pathway. *Cell Microbiol*. 2006;8:301-315. doi:10.1111/j.1462-5822.2005.00622.x
 41. Quan JH, Cha GH, Zhou W, Chu JQ, Nishikawa Y, Lee YH. Involvement of PI 3 kinase/Akt-dependent Bad phosphorylation in *Toxoplasma gondii*-mediated inhibition of host cell apoptosis. *Exp Parasitol*. 2013;133:462-471. doi:10.1016/j.exppara.2013.01.005
 42. Chuenkova MV, Pereira MA. A trypanosomal protein synergizes with the cytokines ciliary neurotrophic factor and leukemia inhibitory factor to prevent apoptosis of neuronal cells. *Mol Biol Cell*. 2000;11:1487-1498. doi:10.1091/mbc.11.4.1487
 43. Del Pilar Aoki M, Cano RC, Pellegrini AV, et al. Different signaling pathways are involved in cardiomyocyte survival induced by a *Trypanosoma cruzi* glycoprotein. *Microbes Infect*. 2006;8:1723-1731. doi:10.1016/j.micinf.2006.02.010
 44. Contreras-Ochoa CO, Lagunas-Martínez A, Belkind-Gerson J, Díaz-Chávez J, Correa D. *Toxoplasma gondii* invasion and replication within neonate mouse astrocytes and changes in apoptosis related molecules. *Exp Parasitol*. 2013;134:256-265. doi:10.1016/j.exppara.2013.03.010
 45. Senichkin VV, Streletskaia AY, Zhivotovsky B, Kopeina GS. Molecular comprehension of Mcl-1: from gene structure to cancer therapy. *Trends Cell Biol*. 2019;29:549-562. doi:10.1016/j.tcb.2019.03.004
 46. Zeng J, Chen Q-W, Yu Z-Y, et al. Regulation of intrinsic apoptosis in cycloheximide-treated macrophages by the Sichuan human strain of Chinese *Leishmania* isolates. *Acta Trop*. 2016;153:101-110. doi:10.1016/j.actatropica.2015.10.010
 47. Getti GT, Cheke RA, Humber DP. Induction of apoptosis in host cells: a survival mechanism for *Leishmania* parasites? *Parasitology*. 2008;135:1391-1399. doi:10.1017/S0031182008004915
 48. van Zandbergen G, Klinger M, Mueller A, et al. Cutting edge: neutrophil granulocyte serves as a vector for *Leishmania* entry into macrophages. *J Immunol*. 2004;173:6521-6525. doi:10.4049/jimmunol.173.11.6521
 49. Ranatunga M, Rai R, Richardson SCW, et al. *Leishmania aethiopica* cell-to-cell spreading involves caspase-3, Akt, and NF- κ B but not PKC- δ activation and involves uptake of LAMP-1-positive bodies containing parasites. *FEBS J*. 2020;287:1777-1797. doi:10.1111/febs.15166
 50. Borrás C, Mas-Bargues C, Román-Domínguez A, et al. BCL-xL, a mitochondrial protein involved in successful aging: from *C. elegans* to human centenarians. *Int J Mol Sci*. 2020;21:418. doi:10.3390/ijms21020418
 51. Follis AV, Chipuk JE, Fisher JC, et al. PUMA binding induces partial unfolding within BCL-xL to disrupt p53 binding and promote apoptosis. *Nat Chem Biol*. 2013;9:163-168. doi:10.1038/nchembio.1166
 52. Chipuk JE, Kuwana T, Bouchier-Hayes L, et al. Direct activation of Bax by p53 mediates mitochondrial membrane permeabilization and apoptosis. *Science*. 2004;303:1010-1014. doi:10.1126/science.1092734
 53. Leu JI-J, Dumont P, Hafey M, Murphy ME, George DL. Mitochondrial p53 activates Bak and causes disruption of a Bak-Mcl1 complex. *Nat Cell Biol*. 2004;6:443-450. doi:10.1038/ncb1123

How to cite this article: Rodríguez-González J, Wilkins-Rodríguez AA, Gutiérrez-Kobeh L. Involvement of Akt and the antiapoptotic protein Bcl-xL in the inhibition of apoptosis of dendritic cells by *Leishmania mexicana*. *Parasite Immunol*. 2022;e12917. doi:10.1111/pim.12917